

FIJACION DE CONDICIONES DE PROCESAMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN HIDROLIZADO DE PEPITONA (*Arca zebra*) PARA CONSUMO HUMANO

Santiago Baixeras¹ y Gonzalo Luna¹

Facultad de Ciencias,
Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

RESUMEN

Se utilizaron las enzimas proteolíticas papaína y bromelina para elaborar dos hidrolizados proteínicos a partir de pepitona (*Arca zebra*), con la finalidad de obtener productos de alto valor nutritivo destinados al consumo humano.

Con miras a lograr la mayor eficiencia del proceso hidrolítico, se estudiaron las condiciones óptimas de hidrólisis de cada enzima sobre este sustrato. Se concluyó que la carne de pepitona debe ser homogenizada en la relación de 1:2 con respecto al medio diluyente, obteniéndose un homogenizado cuyo valor de pH está comprendido entre 6.4 y 6.5, con un contenido de nitrógeno total de 0.97% (p/v).

En función del rendimiento de nitrógeno soluble, se encontró que los parámetros óptimos de hidrólisis son: dos horas a 40°C para ambas enzimas, a un pH de 7 para la papaína, y a pH natural 6.4 para la bromelina, así como una concentración de enzima de 0.2 y 0.3 (g enzima/100 g de carne) para la bromelina y la papaína, respectivamente.

INTRODUCCION

Debido a la calidad de las proteínas de los productos alimenticios de origen animal, su consumo es recomendable en la nutrición humana. La obtención de concentrados proteínicos solubles de pescado constituye una alternativa importante gracias a la excelente composición de aminoácidos que ofrecen, lo que unido a sus características funcionales, permiten utilizarlos en la elaboración de diferentes alimentos terminados.

En Venezuela, donde los recursos pesqueros son importantes, la utilización de moluscos como la pepitona —que es un recurso que se considera subexplotado en el país— representa una expectativa promisoría

Manuscrito modificado recibido: 18-6-85.

1 Miembro del Departamento de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, Apartado 47097, Caracas 1041-A, Venezuela.

para la elaboración de concentrados proteínicos resultantes de la proteólisis enzimática. La explotación en mayor escala de este molusco se inició principalmente a partir de 1960 (1), y ha ido en aumento progresivo durante los últimos años (2).

Como consecuencia de lo expuesto, se llevó a cabo el trabajo aquí descrito, cuya finalidad fue determinar las condiciones óptimas de hidrólisis, empleando la carne de pepitona como sustrato y, papaína y bromelina como enzimas proteolíticas.

MATERIALES Y METODOS

La pepitona (*Arca zebra*) fue capturada en la localidad de El Morro de Chacopata, Península de Araya, Estado Sucre, Venezuela. Luego, se transportó a los laboratorios del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Central de Venezuela en Caracas, donde fue procesada tal como lo indica la Figura 1, para utilización de su carne.

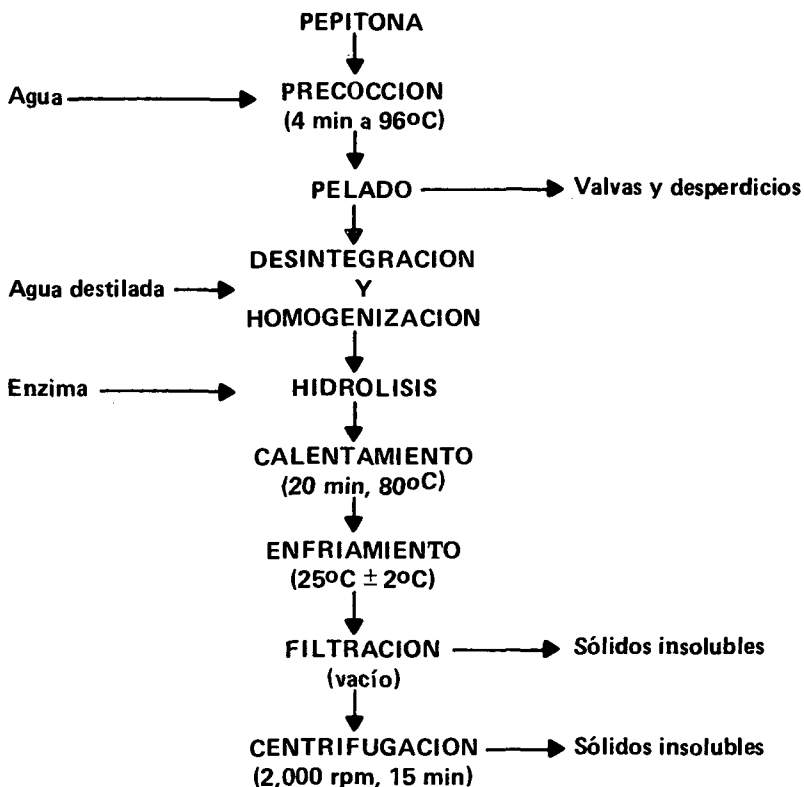


FIGURA 1

Procesamiento de la pepitona (*Arca zebra*)

La desintegración y homogenización de la carne, en una relación de carne a agua de 1:2 (determinada previamente como la más adecuada), se realizó en una licuadora marca Osterizer, Modelo 045021. Los homogenizados fueron dispuestos en fiolas de 500 ml, donde se determinaron los parámetros óptimos de hidrólisis que se detallan a continuación.

1. *Tiempo Optimo de Hidrólisis*

Un grupo de homogenizados se incubó por diferentes períodos de tiempo (0, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas) a una temperatura controlada de 35°C, con agitación constante en agitadores eléctricos marca New Brunswick Scientific Company, Modelo V.S., y a un pH de 6.4 (pH natural). Las enzimas se adicionaron en cada fiola como solución al 10/o, recién preparada, hasta una concentración final de 0.050/o (peso de enzima/peso de carne). La hidrólisis se detuvo inactivando la enzima a 80°C durante 20 minutos por inmersión de las fiolas en agua hirviendo.

2. *pH Optimo de Hidrólisis*

Un grupo de homogenizados se ajustó a diferentes valores de pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0, 8.5 y 9.0), utilizando para ello ácido sulfúrico concentrado ($d = 1.8$) o hidróxido de sodio al 600/o, según se requirió. Las mediciones de pH se hicieron en un potenciómetro Corning Scientific Instrument, Modelo 5. La enzima se agregó a cada fiola en las mismas condiciones que se especifican en el punto 1. Los frascos se incubaron durante seis horas a una temperatura controlada de 40°C, utilizando baños de aceite con agitador marca American Optical, Modelo 406015. El proceso hidrolítico se detuvo en la forma ya mencionada en el punto 1.

3. *Temperatura Optima de Hidrólisis*

Un grupo de homogenizados se incubó a diferentes temperaturas constantes (30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C y 60°C). Las temperaturas de hidrólisis fueron reguladas en baños de aceite con el agitador marca American Optical, Modelo 406015, ya citado. La hidrólisis se llevó a cabo a un pH de 7 para el caso de las fiolas incubadas con papaína y a un valor de pH de 6.4 (pH natural) en el de las fiolas incubadas con bromelina, por haberse determinado éstos como óptimos para cada enzima. El tiempo de hidrólisis fue de seis horas para cada enzima, la cual fue añadida a cada fiola, deteniéndose la hidrólisis en la misma forma que se especifica en el punto 1.

4. *Relación Optima de Enzima/Sustrato*

Un grupo de homogenizados se incubó durante seis horas a los valores de pH y de temperatura óptimos para cada enzima. A partir de la concentración de enzima al 10/o, dicha concentración se fijó en los siguientes valores: 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 (peso enzima/peso carne).

Estas pruebas se hicieron en duplicado, utilizando como enzimas proteolíticas papaína (Merck Art. 7147, actividad 1:350 de poder digestivo relativo a la albúmina de huevo), y bromelina (BDH Biochemicals, activi-

dad 1,200 GDU/g). Se comparó la eficiencia de la hidrólisis para cada enzima.

5. *Grado de Hidrólisis*

La fracción de nitrógeno soluble obtenida en cada hidrolizado fue separada por filtración a vacío en un embudo Buchner, empleando papel de filtro Whatman No. 1. Luego se llevó a cabo una centrifugación posterior a 2,000 rpm en una centrifuga marca DAMON/IEC Division, Modelo CRU-5000, con cabezal International IEC 259 5/77.

En este sobrenadante se determinó el contenido de nitrógeno soluble total por el método del micro-Kjeldahl de la AOAC (3), el cual se utilizó como criterio para establecer el rendimiento obtenido en la hidrólisis. Se realizaron entonces los siguientes análisis: peso total de la fase líquida, proteína soluble precipitable (4 y 5), contenido de sólidos totales por evaporación previa del agua en baño de maría, y posterior evaporación total en estufa al vacío a 80°C.

Los contenidos de humedad, cenizas, grasa y nitrógeno total fueron determinados de acuerdo con los métodos de la AOAC (3). Los carbohidratos se determinaron por diferencia.

6. *Pruebas Adicionales*

- a. Se llevó a cabo una hidrólisis en condiciones óptimas con las dos enzimas, y se comparó el rendimiento con el alcanzado por la actividad remanente de las enzimas naturales del molusco, al incubar un homogenizado a pH natural (6.4–6.5) durante dos horas a 40°C, sin adicionar las proteasas.
- b. Se invirtió la fase de separación de sólidos solubilizados en la hidrólisis, realizando primero la centrifugación y luego, la filtración, al contrario de como lo indica la Figura 1.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. *Evaluación de la Composición Química de la Carne de Pepitona (Arca zebra)*

Los resultados del análisis químico de la carne, que se muestran en la Tabla 1, evidencian que el contenido proteínico (nitrógeno total x 6.25) en esta especie es considerablemente alto, y superior a los valores notificados para moluscos (6), encontrándose dentro de los valores límites citados para las pepitonas de esta especie capturadas en otras zonas de Venezuela (7). Lo mismo aplica al contenido de grasa y de humedad.

2. *Fijación de los Parámetros Optimos de Hidrólisis*

a. *Homogenización.* La relación de peso de carne a volumen de agua 1:2 demostró ser la más adecuada, ya que se obtiene así una perfecta uniformidad del cuerpo del homogenizado, sin observarse separación de fases por exceso de dilución, ni rigidez del homogenizado que podría

TABLA 1

ANALISIS PROXIMAL DE LA CARNE DE PEPITONA (*Arca zebra*)

Composición (g/100 g)	Carne de pepitona
Humedad	76.26
Cenizas	1.17
Grasa	2.68
Proteína (N x 6.25)	17.53
Carbohidratos	2.36

Los valores notificados son el promedio de determinaciones realizadas por triplicado.

limitar la difusión de las moléculas de enzima y disminuir la efectividad del proceso hidrolítico. Esta relación 1:2 (peso/volumen) ha sido informada como la más adecuada en otras oportunidades (4).

b. *Efecto del tiempo sobre el rendimiento de la hidrólisis.* La desintegración avanzada de las proteínas del sustrato implica períodos prolongados de tiempo que pueden ocasionar un incremento inadecuado en los costos de elaboración. Por otra parte, en ocasiones es conveniente evitar un aumento excesivo del fraccionamiento de los péptidos obtenidos en la hidrólisis proteínica (8). El criterio utilizado más comúnmente es la medición de la tasa de hidrólisis, sin considerar el grado de digestión obtenido (9). En relación a esto último, los resultados obtenidos (Figura 2) señalan que durante las dos primeras horas de hidrólisis con bromelina, se obtuvo un rendimiento en nitrógeno soluble aproximado de 44% (p/v), mientras que al cabo de ocho horas se llega a 47% (p/v), tan sólo un 30% de aumento luego de seis horas más. Para la hidrólisis con papaína ese aumento después de seis horas es de aproximadamente 50%, lo que evidencia que en ambos casos las dos primeras horas producen la eficiencia máxima de hidrólisis.

La marcada disminución en la tasa de solubilización a medida que transcurre el tiempo, se atribuye a una o más de las siguientes causas: a) la aproximación al estado de equilibrio en la reacción hidrolítica; b) la formación de productos inhibidores, y c) la desactivación enzimática por la vía de la autólisis, siendo más importantes los dos primeros factores (10).

En esta experiencia pudo demostrarse que existe una similitud entre el comportamiento de la papaína y el de la bromelina frente a la proteína de la pepitona en el tiempo, evidenciándose que la bromelina es más eficiente que la papaína en cuanto a su capacidad de solubilizar el nitrógeno de la proteína de este molusco. Otros autores (11) han encontrado que la bromelina es superior a la papaína en sus estudios de hidrólisis de pescado, aunque en sus experiencias los investigadores en cuestión indican la necesidad de utilizar un agente reductor para lograr una efectividad real de la bromelina.

c. *Efecto del pH sobre el rendimiento de la hidrólisis.* En una célula, la actividad de una enzima ante el pH está influenciada no sólo por los

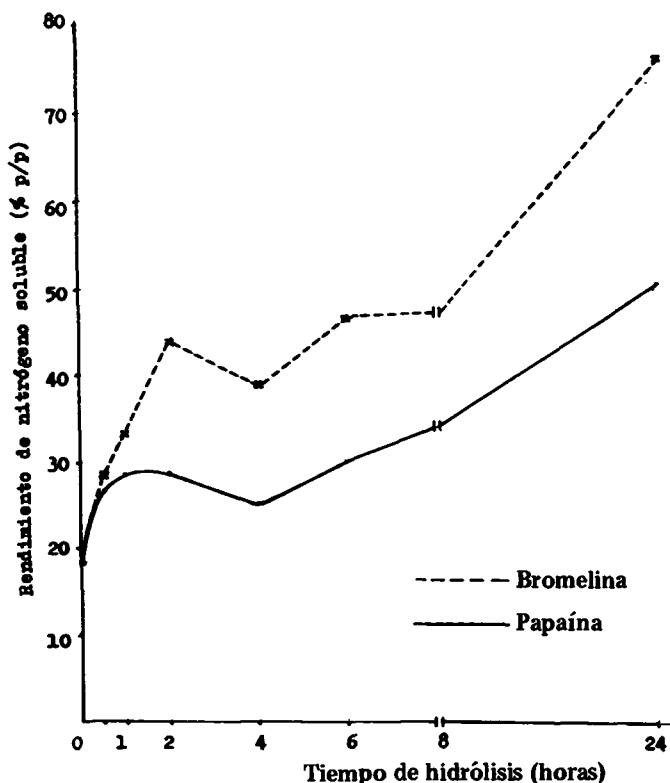


FIGURA 2

Efecto del tiempo sobre el rendimiento de la hidrólisis. Temperatura = 32°C; pH = natural (6.4-6.5); nivel inicial de sustrato = 355.87 mg/ml; razón de enzima a nivel inicial de sustrato = 0.050/o (p/p). Contenido de nitrógeno total del homogenizado = 0.970/o (p/v). Constituye el 1000/o

cambios que ocurren en la ionización de la molécula de enzima, del sustrato o del complejo enzima-sustrato (12), sino también por el efecto que el pH tenga sobre las demás enzimas de la célula. Así, la respuesta observada será el resultado global de la actividad de todas esas enzimas frente a ese determinado valor de pH (13). Es importante señalar aquí esta consideración, puesto que en el presente trabajo pudo demostrarse que sí existe una ligera actividad remanente de las enzimas naturales de la carne de pepitona luego de realizada la precocción.

Los resultados del estudio del efecto del pH sobre la eficiencia de las proteasas ensayadas, que ilustra la Figura 3, evidenciaron un valor máximo de rendimiento de hidrólisis cuando las condiciones de pH se ajustan a 7 al emplear la papaína, y un rango casi constante de máxima actividad cuando el pH varía entre 6.0 y 8.5 al emplear la bromelina. Se concluye así, que para esta enzima el valor de pH natural del homogenizado (6.4-

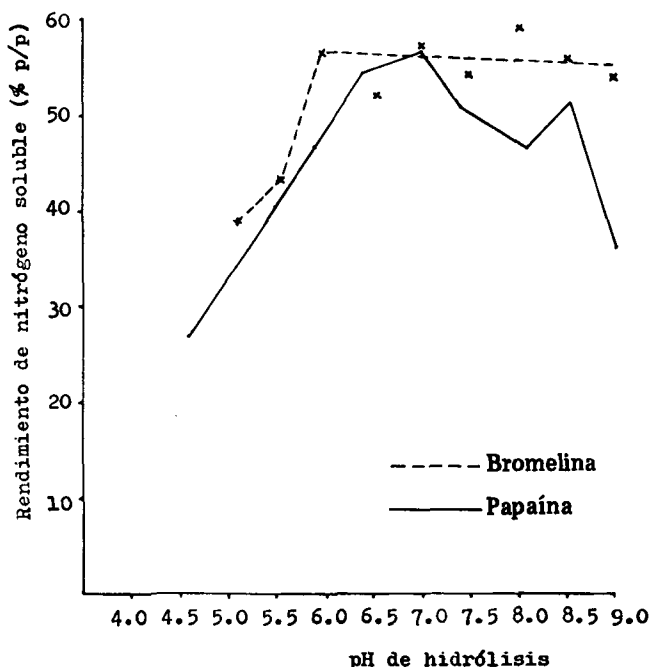


FIGURA 3

Efecto del pH sobre el rendimiento de la hidrólisis. Temperatura = 32°C; tiempo = 6 horas; nivel inicial de sustrato = 355.87 mg/ml; razón de enzima a nivel inicial de sustrato = 0.05% (p/p). Contenido de nitrógeno total del homogenizado = 0.97% (p/v). Constituye el 100%

6.5) es el adecuado. Estas condiciones de pH cercanas a la neutralidad también han sido encontradas como óptimas por varios investigadores en sus trabajos con papaína y bromelina para hidrolizar la proteína del pescado (8, 14-16).

d. *Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de la hidrólisis.* Los resultados de esta experiencia que se presentan en la Figura 4, evidenciaron que ambas enzimas tienen un óptimo de actividad catalítica a 40°C, mientras que a 45°C se aprecia el menor rendimiento. Según los autores (12), esta última es la temperatura a la cual se inactivan muchas enzimas normalmente empleadas en el procesamiento de alimentos. Por encima de 40°C-50°C la mayoría de las proteínas son cada vez más inestables y comienzan a desnaturalizarse (13).

También en esta experiencia pudo comprobarse que ambas enzimas presentan un comportamiento muy similar ante la temperatura de hidrólisis, siendo la bromelina la enzima con más capacidad de solubilizar la proteína de pepitona.

e. *Efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de la*

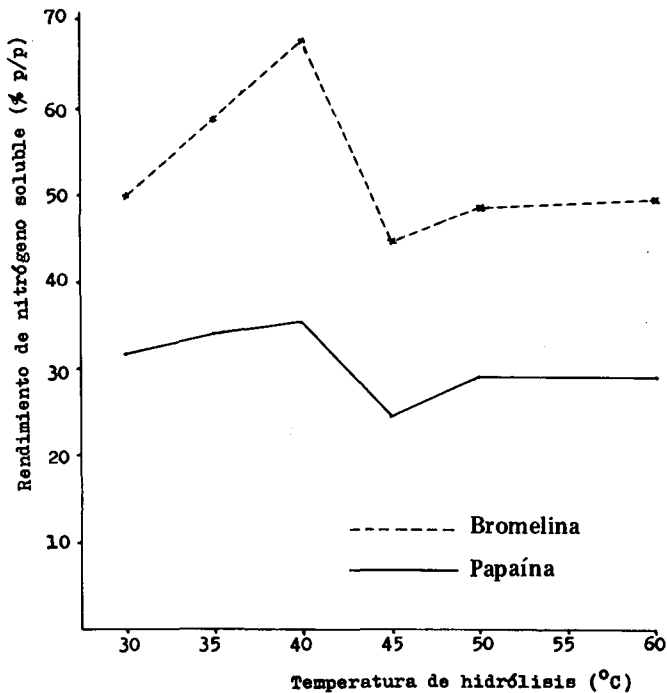


FIGURA 4

Efecto de la temperatura sobre el rendimiento de la hidrólisis. Tiempo = 6 horas; pH natural (6.4-6.5) para la bromelina, y pH 7 para la papaína; nivel inicial de sustrato = 355.87 mg/ml; razón de enzima a nivel inicial de sustrato = 0.05% (p/p). Contenido de nitrógeno total del homogenizado = 0.97% (p/v). Constituye el 100%

hidrólisis. En un proceso hidrolítico, en el momento en el que la cantidad de enlaces peptídicos disponibles a la enzima obligue a una situación en la que el sustrato se convierta en un factor limitante para la reacción, se tendrá una velocidad constante de reacción, a pesar de que se aumente significativamente la concentración de la enzima. En este caso, la especificidad de la enzima es el motivo limitante del proceso hidrolítico, ya que no se conoce ninguna enzima capaz de hidrolizar todos los tipos de enlaces peptídicos que contienen las proteínas. Para lograr esto sería necesario emplear mezclas de enzimas con varias especificidades diferentes (17). Por otro lado, la posible interacción de las enzimas con las partículas sólidas del sustrato pueden ocasionar, por un efecto de adsorción de la enzima, un leve incremento de la tasa de solubilización, o ninguno.

Una de éstas o ambas pueden ser el motivo por el cual a partir de una concentración de 0.2% si se usa bromelina, y de 0.3% si se usa papaína, no se aprecie un incremento importante en la cantidad de nitrógeno soluble como consecuencia de la hidrólisis, tal como se observa en la Figura 5.

Ajeno a ello, los resultados obtenidos evidencian una vez más, la

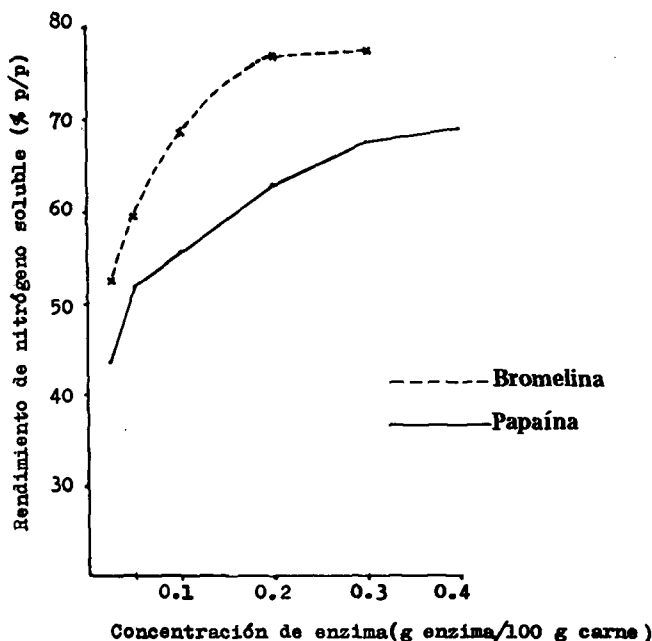


FIGURA 5

Efecto de la concentración de enzima sobre el rendimiento de la hidrólisis. Temperatura = 40°C; tiempo = 6 horas; pH natural (6.4-6.5) para la bromelina y pH 7 para la papaína; nivel inicial de sustrato = 355.87 mg/ml. Contenido de nitrógeno total del homogenizado = 0.97% (p/v). Constituye el 100%

mayor efectividad de la bromelina sobre la papaína como enzima proteolítica de la proteína de la pepitona.

f. *Inversión de la fase de separación de sólidos solubles.* Realizando la centrifugación se agiliza la filtración posterior, reduciéndose el tiempo de procesamiento. Sin embargo, esta modificación ocasiona un menor rendimiento de nitrógeno total en el sobrenadante (aproximadamente 16% menos p/v). Considerando que el interés fundamental de esta investigación fue obtener el mayor contenido posible de nitrógeno soluble en el producto (sobrenadante), se concluye que la secuencia apropiada es la que se indica en la Figura 1.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE PROCESSING CONDITIONS FOR PREPARING A PEPITONA (*Arca zebra*) HYDROLYSATE FOR HUMAN CONSUMPTION

For the purpose of obtaining two protein hydrolysates from pepitona (*Arca zebra*), to be used as nutritional ingredients in accepted food items destined for human consumption, the enzymes bromelain and papain were studied.

The effect of adding each of these proteases, on the rate of hydrolysis and conversion extent of insoluble pepitona protein to soluble nitrogen, were examined. Distilled water was added to the raw material to give a 2:1 ratio of solvent to pepitona, and mixed to produce a slurry at a pH of 6.4-6.5, with a total nitrogen value of 0.97% (w/v).

Optimum conditions of hydrolysis were found to be two hours at 40°C for both enzymes, at a pH of 7 and 0.3 g enzyme/100 g pepitona for papain, and a 0.2 g enzyme/100 g pepitona at pH 6.4 normally found in pepitona in the case of bromelain.

BIBLIOGRAFIA

1. Salaya, J. J. *La Pesca de la Pepitona (Arca zebra) en el Oriente de Venezuela*. Caracas, Proyecto de Investigación y Desarrollo Pesquero, 1971. (Informe Técnico No. 27 MAC-PNUD-FAO).
2. Ministerio de Agricultura y Cría (MAC). *Anuarios Estadísticos Agropecuarios. República de Venezuela, 1976-1981*. Caracas, Dirección General de Planificación del Sector Agrícola. Dirección de Estadística, 1981.
3. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. Washington, D.C., The Association, 1980.
4. Koury, B., J. Spinelli & D. Wieg. Protein autolysis rates at various pH's and temperatures in the Hake merluccius products, and Pacific herring, *Clupea harengus pallasi*, and their effect on yield in the preparation of fish protein concentrates. *Fish Bull.*, **69**:241, 1971.
5. Spinelli, J., H. S. Groninger Jr. & B. Koury. Preparation and properties of chemically and enzymically modified protein isolates for use as food ingredients. *J. Food Sci.*, **37**:283, 1972.
6. Carteni, A. & G. Aloj. Composizione chimica di animali marini del Golfo di Napoli. II. Selacci, molluschi e crustacei. *Quaderni Nutriz.*, **2**:219, 1934.
7. Asociación Latinoamericana de Acuicultura. *Primer Simposium, celebrado del 5 al 12 de noviembre en Caracas, Venezuela. Estudio del Crecimiento, Valor Nutritivo y Composición Química de la Pepitona (Arca zebra)*, 1977.
8. Sripathy, N. V., D. P. Sen, N. L. Lahiry, A. Sreenivasan & V. Subrahmanyam. Fish hydrolysates. II. Standardization of digestion conditions for preparation of hydrolysates rich in peptones and proteases. *Food Technol.*, **16**:141, 1962.
9. Hale, M. B. Relative activities of commercially-available enzymes in the hydrolysis of fish protein. *Food Technol.*, **23**:107, 1969.
10. Bhumiratana, S., C. G. Hill Jr. & C. H. Amundson. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate in membrane reactors. *J. Food Sci.*, **42**:1016, 1977.
11. Beddows, C. G. & A. G. Ardeshir. The production of soluble fish protein for use in fish sauce manufacture. II. The use of acids at ambient temperature. *Food Technol.*, **14**:613, 1979.

12. Red, G. **Enzymes in Food Processing**. 2nd end. New York, N.Y., Academic Press, Inc., 1975, p. 31.
13. Lehninger, A. L. **Bioquímica**. 6a. ed. Barcelona, Ediciones Omega, S. A., 1976.
14. Sen, D. P., N. V. Sripathy, N. L. Lahiry, A. Sreenivasan & V. Subrahmanyam. Fish hydrolysates. I. Rate of hydrolysis of fish flesh with papain. **Food Technol.**, **16**: 138, 1962.
15. Das, K., N. A. Shukri & S. K. Al-Nasiri. Protein concentrate from waste catfish and its quality improvement by enzyme. **J. Food Sci. Technol.**, **16**:58, 1979.
16. Groninger Jr., H. S. & R. Miller. Preparation and aeration properties of an enzyme-modified succinilated fish protein. **J. Food Sci.**, **40**:327, 1975.
17. Hill, R. L. Hydrolysis of protein. **Advan. Prot. Chem.**, **20**:37, 1965.