

## Control de la actividad proteolítica en ensilado de pescado

Tomé Elisabetta<sup>1</sup>, Levy Benshimol Abraham<sup>2</sup>, Bello Rafael Antonio<sup>3</sup>

Universidad Central de Venezuela

**RESUMEN.** Se elaboró un ensilado microbiano a partir de una mezcla de pescados de bajo valor comercial y la adición de 15% de melaza, almacenándolo a 35° C. Se realizaron experiencias para observar el efecto de la adición de una preparación comercial de bromelina (0,20-0,90%) sobre el proceso de obtención del ensilado. Estas concentraciones fueron calculadas en base a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas en este trabajo. La licuefacción del ensilado se evaluó por medio de determinaciones de consistencia (cm recorridos en 30 s) y de nitrógeno no proteico. Los resultados indican que la adición de bromelina (0,7% ó más) acorta considerablemente el tiempo de licuefacción del producto obteniéndose la mayor actividad proteolítica en las primeras 3 horas de almacenamiento. Tales ensilados alcanzaron su licuefacción máxima en 12 horas en comparación con ensilados a los que no se les adicionó bromelina los cuales se licuaron en 15 días. Por lo tanto, se recomienda la inclusión de la preparación de bromelina comercial para la obtención de los ensilados.

**SUMMARY.** Proteolytic activity control in fish silage. Microbial fish silage was produced from grinded low commercial fish species added with 15% molasses and stored at 35°C. Experiment were conducted to evaluate the effect of the addition of a commercial preparation of bromelina (0.20-0.90%) to the fish silage. Liquefaction was evaluated measuring both the product consistency and its non protein nitrogen content. Results indicate that bromelina addition (0.7 or higher), increases dramatically the rate of proteolysis and decreases the time required for liquefaction from 15 days (no enzyme control) to only 12 hours. Therefore, the use of the commercial preparation of bromelina is highly recommended for silage production.

### INTRODUCCION

El ensilado microbiano de pescado puede definirse como un producto líquido obtenido por fermentación bacteriana, en el cual el pescado molido se mezcla con una fuente de carbohidratos y un cultivo microbiano, que produce el ácido requerido para la preservación del producto.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se utilizó la fauna de acompañamiento del camarón, con 15% de melaza y 1% de *Lactobacillus plantarum*, para elaborar ensilados a 30 ± 2°C en anaerobiosis, tardándose 15 días en obtener un

producto estable y de adecuadas características sensoriales. Los ensilados fueron evaluados nutricionalmente alimentando pollos y cerdos con resultados satisfactorios (1,2).

Ensilados elaborados a partir de pescados enteros de bajo valor comercial con 15% de melaza y 1% de inóculo y almacenados a diferentes temperaturas alcanzaron valores de pH inferiores a 4,5 en 24 horas cuando se les adicionó desechos de frutas (papaya y piña) (3). Así mismo, la adición de estos desechos mejoró la eficiencia del proceso, puesto que incrementaba notablemente la licuefacción del ensilado. Esta mejora se ha atribuido a la presencia de enzimas proteolíticas (bromelina y papaína) en los desechos de piña y lechosa.

Las características bioquímicas del ensilado lo convierten en una materia prima factible de ser utilizada para la alimentación animal. Así, la inclusión de un ensilado de pescado elaborado por vía microbiana con desechos de papaya y piña, a un nivel del 15% en dietas para gallinas ponedoras, no afectó parámetros productivos importantes (producción de huevos,

1 Profesora del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela.

2 Coordinador y Profesor del Centro de Biología Celular, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela

3 Director y Profesor del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Escuela de Biología, Universidad Central de Venezuela

consumo de alimento, ganancia de peso y conversión de alimento) (4).

La posibilidad de integrar otros insumos del sector primario de la economía del país tales como sub-productos agrícolas, al pescado ofertado por la pesca industrial o por la pequeña pesquería, son aspectos que merecen ser estudiados en torno a la tecnología del ensilado.

El presente trabajo persigue conocer la concentración de bromelina y papaína requerida para optimizar el proceso de obtención de ensilado microbiano de pescado a fin de controlar el proceso.

## MATERIALES Y METODOS

Las preparaciones de papaína y bromelina utilizadas como estándar fueron obtenidas en Sigma Chemical Co., St. Louis MO. La papaína utilizada en la fabricación del ensilado de pescado se obtuvo del látex de la papaya y se presentó en forma de polvo crudo (E.C. 3.4.22.2.) con 2,8 Unidades/mg de sólido; mientras la bromelina (E.C. 3.4.22.4.), con 1870 Unidades/mg de sólido, se presentó en forma cristalina.

**Preparación de las enzimas y de las muestras:** La muestra a ser empleada como sustrato, en la medición de la actividad enzimática fue una mezcla de pescados de bajo valor comercial que incluía proporciones iguales de sardina (*Sardinella anchovia*) y perlitá (*Lepophidium profundorum*).

El pescado se molió entero (con cabeza, vísceras y esca-mas) en un moledor de carne marca BOIA HD, modelo 8122, con criba de 3,5 mm de diámetro. El producto molido fue liofilizado (liofilizador LABCONCO, modelo 180) durante 12 horas. El liofilizado fue colocado en envases herméticos y conservado a -10°C para su posterior uso, o bien fue suspendido en una solución de buffer fosfato de potasio 0,03M pH 7,2, mediante agitación a 4°C durante 2 horas. Posteriormente se procedió a una centrifugación (centrífuga marca Sorvall, modelo RC-5B) a 6000g durante 10 minutos a  $\pm$  2°C.

El sobrenadante se dializó durante 72 horas a 4°C en tubos de diálisis de apertura de poro de 12.000. En las primeras 48 horas del proceso, los tubos de diálisis fueron colocados en agua destilada con gotas de tolueno (para evitar la contaminación de la muestra); en las 24 horas restantes la diálisis se realizó con solución buffer fosfato de potasio 0,03M a pH 7,0; 5,5 ó 4,0 según el ensayo a efectuar. Finalizado este tiempo, se verificó el pH del dializado y se determinó la concentración de proteínas (5).

Las muestras fueron guardadas a 2°C en frascos cerrados. El tiempo máximo de almacenamiento fue de una semana, puesto que después de este tiempo se descomponían.

**Medición de la actividad enzimática:** El método para la medición de la actividad enzimática se basó en la estimación de los productos de digestión de bajo peso molecular (material

soluble en ácido tricloroacético), formados a partir de las proteínas del pescado en presencia de la enzima, midiendo la absorbancia en la solución sobrenadante a 280 nm ó 275 nm dependiendo de la enzima (6,7).

Para estimar el efecto del tiempo sobre la actividad de la bromelina en la hidrólisis de las proteínas de la carne de pescado a pH 5,5, las muestras se incubaron a 35°C empleando diversos tiempos de incubación (30, 40, 50, 60, 120, 180, minutos) (6,7). Se efectuaron controles para establecer si ocurrió autodigestión de la enzima y autoproteólisis del sustrato durante el tiempo que duró el ensayo.

Se elaboraron 5 tipos de ensilados los cuales diferían en la concentración de bromelina adicionada. Estas concentraciones incluyeron: 0,00% (control); 0,20; 0,45%; 0,70% y 0,90% (peso de enzima/100 g de ensilado).

El esquema tecnológico del proceso de elaboración del ensilado microbiano de pescado fue el siguiente: molienda - envasado - acondicionamiento con 15% de melaza - adición de 1% de inóculo - adición de bromelina - homogeneización - almacenamiento.

**Melaza:** Se empleó una melaza proveniente del Central Azucarero de El Consejo, Edo, Aragua, Venezuela.

**Preparación del inóculo:** El inóculo fue obtenido a partir de tubos con caldo MRS los cuales contenían una población de *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 de hasta  $1 \times 10^8$  UFC/g.

**Análisis físico:** El grado de licuefacción del ensilado se estimó con un consistómetro de Bosjtwick. Los resultados se expresan como cm recorridos/30 s.

**Análisis químico:** Se realizaron determinaciones de nitrógeno total (Nt) y de nitrógeno no proteico (NNP). El Nt se determinó según la metodología establecida por el A.O.A.C (8). Para el NNP se realizó precipitación con ácido tricloroacético al 20% (9) seguido de digestión y destilación según el método de micro Kjeldahl (8). Los resultados fueron expresados como porcentaje del Nt.

## RESULTADOS Y DISCUSION

La respuesta de la actividad enzimática de la papaína a las variaciones de pH, sobre las proteínas del pescado, se presenta en la Tabla 1. Se puede apreciar que la actividad es mayor a pH 8,0 y 5,5 que a pH 4,0. Si se compara su actividad a los dos primeros valores de pH se puede concluir que es prácticamente indiferente emplear un pH u otro.

TABLA 1  
ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE UNA  
PREPARACION COMERCIAL DE PAPAÍNA SOBRE  
LAS PROTEINAS DE LA CARNE DE PESCADO A  
TRES VALORES DE pH.

A B S O R B A N C I A (280 nm)			
PAPAÍNA (mg)	pH 8,0	pH 5,5	pH 4,0
0,780	0,177	0,196	0,126
1,300	0,187	0,198	0,142
1,560	0,210	0,198	0,169
1,750	0,236	0,224	0,176
2,350	0,227	0,229	0,193
3,150	0,228	0,223	0,217

En el caso de la actividad de la bromelina (Tabla 2) su mayor actividad se presenta a pH, 5,5 y 7,2. Su actividad se ve afectada a pH 4,0 siendo dos veces menor al compararla con los valores obtenidos a pH 5,5 y 7,2.

TABLA 2  
ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE UNA  
PREPARACION COMERCIAL DE BROMELINA  
SOBRE LAS PROTEINAS DE LA CARNE  
DE PESCADO A TRES VALORES DE pH.

A B S O R B A N C I A (275 nm)			
BROMELINA (mg)	pH 7,2	pH 5,5	pH 4,0
0,500	0,361	0,327	0,117
0,750	—	0,430	0,195
1,000	0,439	0,533	0,235
1,500	0,623	0,601	0,311
2,000	—	0,603	—
3,000	0,703	0,680	0,381

En la Tabla 2 se observa que tanto a pH 7,2 como 5,5 se requiere una cantidad de enzima en el sistema de 1,5 mg ó más para alcanzar la velocidad máxima de la reacción, lo que equivale a 5% de proteína (peso de proteína enzimática/100 de proteína del pescado; relación E:S de 1:20).

Si se comparan las actividades enzimáticas de ambas preparaciones a los tres valores de pH sobresale la superioridad de la bromelina sobre la papaína, incluso a pH 4,0 que es donde su actividad se ve realmente disminuida.

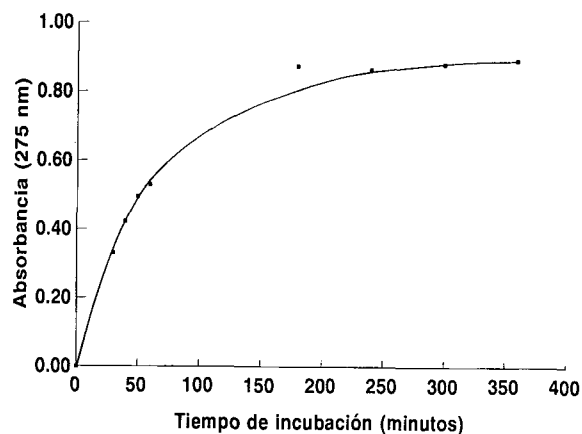
El hecho que la bromelina presente una elevada actividad a un pH ácido (5,5) la hace ideal para ser incorporada en el proceso de obtención del ensilado microbiano de pescado; en tal sentido, varios investigadores han reportado que hidrolizados proteicos elaborados con esta enzima poseen generalmente un adecuado valor nutritivo y no presentan problemas de

toxicidad como consecuencia de la actividad enzimática (10-13).

Establecida la superioridad de la bromelina sobre la papaína en la hidrólisis de las proteínas de pescado, se procedió a estudiar el efecto del tiempo sobre la actividad enzimática de la bromelina a los valores de pH y concentración de enzima establecidos como óptimos en los ensayos anteriores (pH 5,5 y proporción E:S de 1:20).

Los resultados de la actividad hidrolítica de la bromelina sobre las proteínas de la carne de pescado se muestran en la Figura 1. Se puede notar el aumento en la absorbancia a 275 nm a medida que aumenta el tiempo de incubación de la reacción. La evidencia más importante es que la mayor cantidad de proteína hidrolizada se obtiene durante las primeras dos horas de hidrólisis, alcanzando el máximo valor de absorbancia a las tres horas; después los productos de la reacción permanecen más o menos constantes hasta las seis horas de incubación que duró el experimento.

FIGURA 1  
Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad  
proteolítica de la bromelina a pH 5.5 (1.5 mg de proteína)



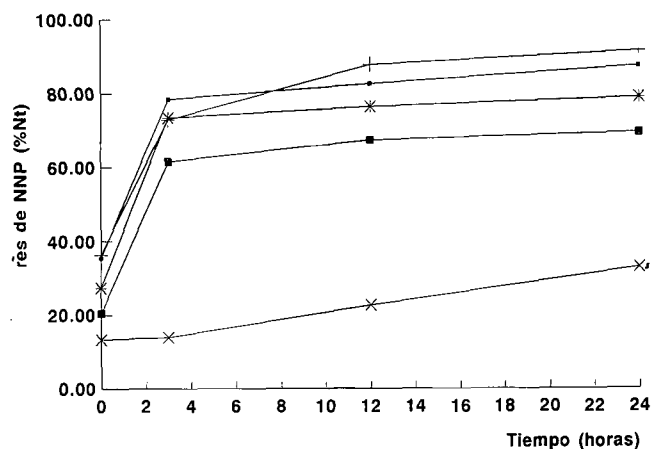
Se concluye entonces que es innecesario prolongar el tiempo de hidrólisis más de tres horas debido a los escasos aumentos que se logran en la proteólisis. En consecuencia, en la elaboración del ensilado de pescado en forma líquida, la máxima licuefacción del producto y los mayores porcentajes de NNP deben alcanzarse al cabo de este tiempo.

A continuación se elaboró el ensilado microbiano de pescado agregando diferentes concentraciones de bromelina, basadas éstas en los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas con anterioridad. Esto permitió establecer cómo influye la cantidad de enzima presente en el sistema sobre el grado de licuefacción del ensilado. También se pudo determinar el tiempo requerido para obtener un producto completamente líquido.

En relación al NNP, originado en la hidrólisis enzimática (Figura 2), se puede notar que en todos los ensilados elaborados, exceptuando el control, sin bromelina, el mayor grado de proteólisis se alcanza al cabo de las tres primeras horas de almacenamiento, y posteriormente sólo ocurre ligeros aumentos en los valores de nitrógeno.

FIGURA 2

Contenido de nitrógeno no proteico (NNP) de ensilados elaborados a partir de una mezcla de pescado, 15% de melaza, 1% de inóculo, concentraciones variables de bromelina, almacenados a 35°C

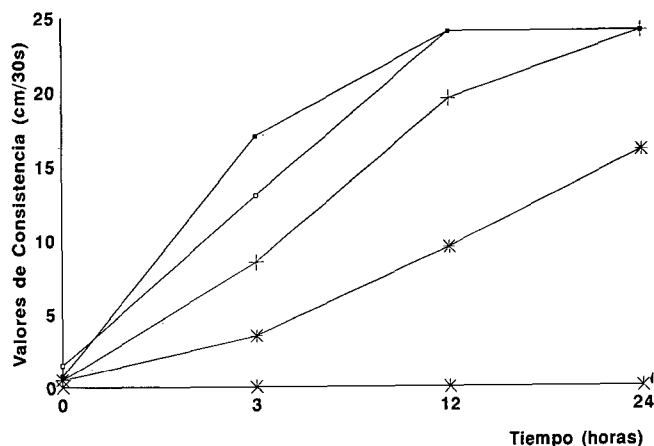


Los resultados de NNP obtenidos en el caso del ensilado E5 (control, sin bromelina), indican la existencia de actividad proteolítica endógena causada por las enzimas naturales presentes en el pescado, detalle este que no se observó en los ensayos bioquímicos, probablemente por los daños causados a estas enzimas durante los tratamientos de liofilización, homogeneización, centrifugación y diálisis a los que fueron sometidas las muestras.

En la Figura 3 se observa que los ensilados E1 y E2, que son los que contienen la mayor concentración de bromelina, tuvieron prácticamente el mismo grado de hidrólisis y alcanzaron licuefacción máxima en el mismo tiempo (12 horas). Los ensilados E3 y E4, con una menor cantidad de bromelina presente, sufrieron hidrólisis más lentamente que los dos anteriores. El E3 alcanzó el mismo valor máximo de licuefacción que E1 y E2 a las 24 horas.

FIGURA 3

Valores de consistencia de ensilados elaborados a partir de una mezcla de pescado, 15% de melaza, 1% de inóculo, concentraciones variables de bromelina, almacenados a 35°C



Estos resultados evidencian que existe una marcada superioridad en la proteólisis cuando se utilizan enzimas comerciales en comparación con la hidrólisis de las enzimas endógenas, lo que pone de manifiesto la importancia que tiene el empleo de la bromelina en este proceso hidrolítico. La puesta en práctica de estos hallazgos permitiría tanto obtener el producto final en un tiempo considerablemente menor al requerido actualmente, como un mejor aprovechamiento de los desperdicios de pescado, fuente invaluable de proteínas, provenientes de las pesquerías y de ciertos sub-productos agrícolas tales como restos de piña, puesto que al determinarse la cantidad de bromelina activa presente en la corteza y/o jugo de piña se establecería, con los logros hallados en este trabajo, la cantidad de tales desechos que deben ser incorporados al proceso para optimizarlo. Más aún, la preparación de bromelina empleada en este trabajo no es costosa, de allí que su uso no aumentaría mayormente el costo del proceso, con la ventaja de tener una licuefacción mucho más rápida, reproducible y controlada.

## REFERENCIAS

1. Guevara Y.; Bello R. y Montilla J. 1989. Evaluación del ensilado de pescado por vía microbiana como suplemento proteico en dietas para pollos de engorde. Arch. Latinoam. Nutr. 4(2): 246-256.
2. Ottati M. Bello R. 1990. «Ensilado microbiano de pescado en la alimentación porcina. II. Evaluación de la canal y caracterización de la carne». Alimentaria, Abril 90, 37-44.
3. Reyes G.; Martínez R.; Rodríguez L.; Bello R. y Pascual M. 1991. «Efecto de la Adición de desechos de frutas tropicales sobre la velocidad de producción de ensilado microbiano de pescado». Alimentaria Enero-Febrero 91, 99-108.

4. Guevara Y. 1992. Estudio sobre la Factibilidad de inclusión de ensilado de pescado elaborado por vía microbiológica, en dietas para aves. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
5. Lowry O.; Rosebough N.; Lewistarr A. y Randall R. «Protein Measurement with the Folin phenol reagent». J. Biol. Chem. 193, 265. 1951.
6. Kunitz, M. 1947. J. Gen. Physiol. 30, 291.
7. Arnoon, R. & Shapira, E. 1967. «Papain». Biochemistry 6, 3942.
8. A.O.A.C. Official Methods of Analysis «Association of Official Agricultural Chemist, 13<sup>th</sup> edition, Washington, DC. 1990.
9. Stansby M; Harrison R.; Dason J. y Sater M. Determining volatile bases in fish. Comparison of precision of certain methods. Industrial and Engineering Chemistry, 16: 593. 1944.
10. Meinke W. 1959. Tenn Eng Expt. Sta. News. Marzo de 1959. Citado por Bertullo, E. 1989.
11. Meinke, W. Food and Nutrition Board NAS-NCR. 2<sup>nd</sup> Mect of Sci. Advis. Common Marine Protein Concentrate. Washington, DC. Marzo 23-25. 1964.
12. Instituto de Fomento Pesquero (Chile). Un proceso para preparar un concentrado proteico de alto valor energético. Solic. Patente en Uruguay N° 17897. Citado por Bertullo, E.; 1989. Desarrollo del ensilado en América Latina. En: «II Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina». FAO RLAC/2 Montevideo.
13. Ballester E., Yanez, E., Brunser O., Stekel A., Chedud P., Castaño G y Monckeberg F. «Safety Evaluation on an Enzymatic Fish Protein Hydrolysate: 10-month Feeding Study and Reproduction Performance in Rats». J. of Food Sci. 42 (2) : 407. 1977.

Recibido: 06-07-1994

Aceptado: 10-08-1995