

Efecto de la relación Enzima/Sustrato en las cinéticas de hidrólisis de hígado de Cerdo

Galván Romero A. R.^{1*}, Mares Mares E.¹, León Galván F.¹, Ozuna C.¹, Gómez Salazar J. A.¹

Universidad De Guanajuato, Departamento De Alimentos, División De Ciencias De La Vida, Campus Irapuato-Salamanca, ex Hacienda el Copal km 9 carretera Irapuato-Silao ap 311 CP. Irapuato, Zona Centro, 36500 Irapuato, Gto.

rozy_199516@hotmail.com, julian.gomez@ugto.mx

RESUMEN:

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la relación enzima/sustrato en las cinéticas de hidrólisis de proteína de hígado de cerdo. Para este propósito, se realizaron extractos de hígado de cerdo y se evaluaron las cinéticas de su hidrólisis a diferentes relaciones de enzima (alcalasa 2.4 L) y sustrato, siendo estas 1/20, 1/50 y 1/100, considerando el pH y la concentración de sustrato constante, y se midió el grado de hidrólisis a través del tiempo. Se aplicaron los métodos de determinación de proteína Bradford y OPA, estos métodos permitieron determinar el grado de hidrólisis de la proteína de hígado. Las cinéticas de la hidrólisis se modelizaron a partir de un modelo exponencial que relacionó la velocidad de hidrólisis a pH y temperatura constante. Los parámetros estimados del modelo fueron se ajustaron adecuadamente con valores del coeficiente de correlación (R^2) superiores a 0.95 y para el porcentaje de varianza estimada mayores a 97%. El grado de hidrólisis fue afectado por la relación de enzima/sustrato, este aumentó a medida que la concentración enzima incrementó, principalmente durante los 30 minutos iniciales..

ABSTRACT:

The objective of this work was to study the effect of the enzyme/substrate relationship on kinetics of hydrolysis of protein pork liver. For this purpose, pork liver extracts were performed, and the kinetics of their hydrolysis were evaluated at different enzyme (alcalasa 2.4 L) to substrate ratios, being these 1/20, 1/50 and 1/100, considering the pH and the substrate concentration constant, and the degree of hydrolysis was measured over time. The Bradford and OPA protein determination methods were applied, these methods allowed to determine the degree of hydrolysis of the liver protein. The kinetics of the hydrolysis were modeled from an exponential model that related the hydrolysis rate to pH and constant temperature. The estimated parameters of the model fit quite well with values of the correlation coefficient (R^2) greater than 0.95 and for the percentage of estimated variance these were greater than 97%. The degree of hydrolysis was affected by the enzyme /substrate ratio, which increased as the enzyme concentration increased, mainly during the initial 30 minutes..

Palabras clave:

Hidrolisis enzimática, cinéticas, proteína de hígado de cerdo, Bradford, OPA

Área: Cárnicos

INTRODUCCIÓN

La Industria cárnica busca generar mayor valor agregado en sus procesos. Dentro de estos se generan diferentes desperdicios tales como sangre, piel, patas, además vísceras que son poco consumidas como lo es el hígado. En el presente trabajo, se consideró como matriz el hígado de cerdo. Este es un producto de bajo consumo en México, que pertenece al grupo de las vísceras, sin embargo, la literatura nos dice que es un producto de alto valor proteico conteniendo 20,68 g. de proteínas, además de otros nutrientes como, vitaminas y minerales.

Uno de los procesos de transformación que generan valor agregado en la industria de alimentos, y principalmente en la industria de la carne, es la hidrólisis. Esta puede realizarse vía enzimática o ácida (Gottschik, 1994, Flemming, 1989). La primera de ellas es un bioproceso de gran utilidad que potencializa las propiedades funcionales de la proteína nativa sin alterar su composición nutricional. Por ello, los hidrolizados proteicos obtenidos por medio de dicho método, tienen una amplia gama de aplicaciones que van desde ingredientes para la preparación de alimentos con buena fuente de nitrógeno, así como en propiedades tecno funcionales, siendo éstas la capacidad de agitación, dispersión y elevada solubilidad (Benítez et al., 2008).

Por otro lado, la hidrólisis ácida consiste en un proceso químico que, mediante el empleo de catalizadores ácidos, transforma las cadenas de polisacáridos que forman la biomasa en sus monómeros elementales (azúcares

fermentables o reductores). (Domínguez et al. 2011). En la actualidad se busca que los tratamientos para obtención de hidrolizados se realicen de forma más eficaz, y sobre todo que se tenga pleno conocimiento del comportamiento de los parámetros cinéticos. De allí la importancia de estudiar las cinéticas de hidrólisis de alimentos poco industrializados como lo es el hígado de cerdo. Por lo anterior, en el presente trabajo se estudia el efecto de la relación enzima/sustrato en las cinéticas de hidrólisis de proteína de hígado de cerdo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico. Se compró en un supermercado el hígado de cerdo empacado y etiquetado a temperatura de refrigeración, que posteriormente se congeló. A partir de las muestras congeladas, se obtuvieron extractos de hígado, para ello se emplearon 5g de muestra, se trituraron con 100mL de agua destilada y se filtraron.

Humedad y pH. La humedad se determinó a partir de 5 g de muestra previamente triturada. Esta se deshidrató en un horno Shel LAB a 100°C durante 24 horas hasta llegar a peso constante. Se determinó el contenido de humedad por cálculo (AOAC. 1997). El pH se determinó a los extractos de hígado con el uso de un pHmetro pH120.

Hidrólisis del extracto de hígado de cerdo. Para las hidrólisis, se empleó el extracto de hígado de cerdo previamente preparado y añadiéndose diferentes cantidades de enzima Alcalasa 2.4L (Sigma Aldrich), 1:100, 1:50, 1:20 (como relación de Enzima/sustrato, w/w). Dichas relaciones se calcularon determinando inicialmente el contenido de proteína de hígado de cerdo (9.612mg/mL) y previas revisiones en la literatura. Antes de la hidrólisis, las suspensiones se ajustaron a pH 8,0 con NaOH 0.1N. Las condiciones de digestión fueron a 50°C y 200rpm durante 90 minutos. Transcurrido el tiempo de digestión, la reacción de hidrolisis enzimática se detuvo por congelación, almacenando las muestras a -20°C.

Electroforesis en gel de Poliacrilamida. La electroforesis de hidrolizados proteicos de hígado en Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo con el método reportado por Huerta-Ocampo (2011). Todos los geles se realizaron en un sistema Tetra Mini-Protean de Biorad en geles de poliacrilamida al 15%. La reducción de puentes disulfuro se realizó con β -mercaptoetanol (1% p/v) a 100°C por 5 minutos. Las condiciones de corrida de electroforesis se realizaron con una corriente inicial de 80 Volts durante 20 minutos, posteriormente a un voltaje de 110 volts durante 2 horas aproximadamente. Después de la electroforesis los geles se tiñeron toda la noche con azul de brillante Commasie G250 en una concentración final de 0.08%. El desteñido se realizó lavando el gel con una solución de 45% de metanol + 5% ácido acético durante 1-3 horas.

Cuantificación por Bradford. Los digeridos hidrolizados se cuantificaron utilizando el método de Bradford con el kit Protein assay de Biorad de acuerdo con las especificaciones del fabricante y al protocolo modificado por León Galván (datos no publicados). Todas las muestras se cuantificaron por triplicado.

Cuantificación grado de hidrólisis. El grado de hidrólisis (DH) se determinará a partir del método de o-ftaldehído (OPA) modificado por Nielsen *et al.*, (2001), donde se utilizaron 1.4g de tetraborato sódico, 30mg de SDS, 26.4mg de DTT, mezclándose en 22.5mL de agua deionizada y 24mg de OPA disuelto en 600 μ L de etanol, este reactivo se preparó al tiempo de las mediciones debido a su baja estabilidad, para la lectura se emplearon celdas de vidrio con 400 μ L de muestra y se le agregaron 3mL del reactivo preparado, se mezclaron por 5s y se dejaron dos minutos para su reacción, las se realizaron las lecturas en un espectrofotómetro (Génesis 10S UV/Vis Thermo Scientific, Estados Unidos) a 340nm. Como control se utilizó una solución de serina al 0.1%.

Modelo matemático. Se utilizó un modelo matemático para el estudio del comportamiento cinético durante la hidrólisis, el cual relaciona la velocidad de hidrólisis a pH y temperatura constante. Dicho modelo ha sido definido por Vaquiro et al. 2016

$$\frac{dx}{dt} = a * e^{-b*t} \quad (1)$$

Donde x es el porcentaje de hidrólisis.

Separando variables e integrando la ecuación 1, obtenemos:

$$x = \frac{1}{b} \ln[1 + abt] \quad (2)$$

En donde a, y b son constantes cinéticas.

La bondad del ajuste de los datos experimentales al modelo (ecuación 5) se calculó mediante el porcentaje de varianza explicada.

$$\% \text{ var} = \left(1 - \frac{S_{yx}^2}{S_y^2} \right) \quad (3)$$

Donde. S_y^2 y S_{yx} son las desviaciones estándar de la muestra y de la correspondiente estimación, respectivamente.

$$S_y^2 = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (X_{i\text{exp}} - \bar{X}_{\text{exp}})^2}{N-1} \right) ; \quad S_{yx}^2 = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (X_{i\text{exp}} - X_{i\text{calc}})^2}{N-2} \right)$$

Donde $X_{i\text{exp}}$ es el valor experimental, \bar{X}_{exp} es el promedio de los valores experimentales, $X_{i\text{calc}}$ es el valor calculado por el modelo y N es el número de determinaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de proteína del extracto filtrado fue de 9.612mg/mL, lo que equivale a 192.24mg de Proteína/g de Hígado, mientras que la humedad fue 70.46% y el pH de 6.32. Por otro lado, la concentración de Enzima (Relación Enzima/sustrato), para la obtención de las cinéticas, se determinó a partir del contenido de proteína de hígado, para 30 ml de solución. En la tabla 1 se muestran las relaciones utilizadas para cada relación E/S.

Tabla 1. Relación E/S utilizadas en la hidrólisis de hígado de cerdo.

	Enzima en polvo	Enzima líquida
1:100	2.74 mg	2.45µL
1:50	5.4972mg	4.92 µL
1:20	13.74mg	12.33 µL

Perfil electroforético del hidrolizado enzimático de hígado

En la Figura 1 se muestra el perfil electroforético de la hidrólisis de la proteína total de hígado de cerdo con alcalasa a diferentes relaciones enzima/sustrato. De acuerdo con el análisis electroforético en condiciones de reducción y desnaturalización, se observaron pesos moleculares principales de 50, 38, 36, 25, 19,17, 15 y 10kDa. Cuando el extracto es sometido a digestión enzimática con alcalasa, las proteínas de 50, 38 y 15 kDa se hidrolizan utilizando una relación de enzima/sustrato (w/w) de 1:20 en los primeros 15 minutos (Figura 1a), observándose proteínas de 37, 32, 31 y 16 kDa como producto de la hidrólisis enzimática. Para la relación 1:50 (Figura 1b) las proteínas menores a 15kDa se hidrolizan a los 30 minutos, y para la relación 1:100 (Figura 1c) se muestra el mismo patrón electroforético durante los 90 minutos de digestión, con hidrólisis mínima.

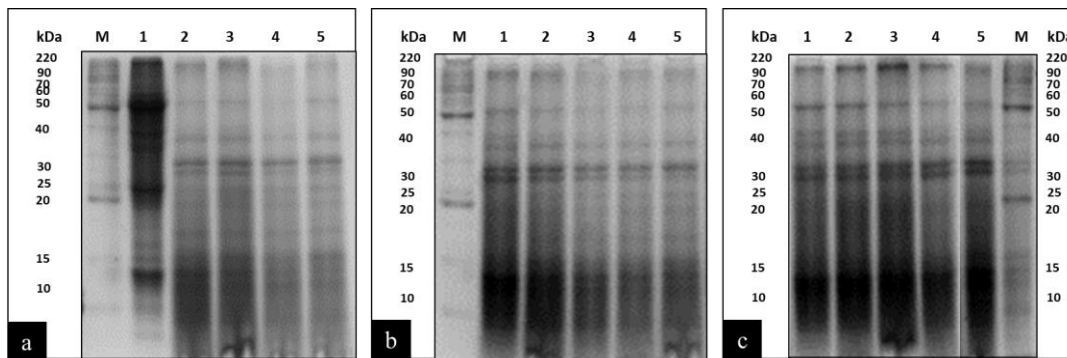


Figura 1. Perfil electroforético de la hidrólisis de la proteína total de hígado de cerdo con alcalasa a diferentes relaciones enzima/sustrato (w/w). Dónde: a) 1:20; b) 1:50 y c) 1:100. Carriles (Tiempos de digestión en minutos): 1) 0, 2) 15, 3) 30, 4) 60, 5) 90 y M) Marcador de peso molecular (kDa).

Contenido de proteína

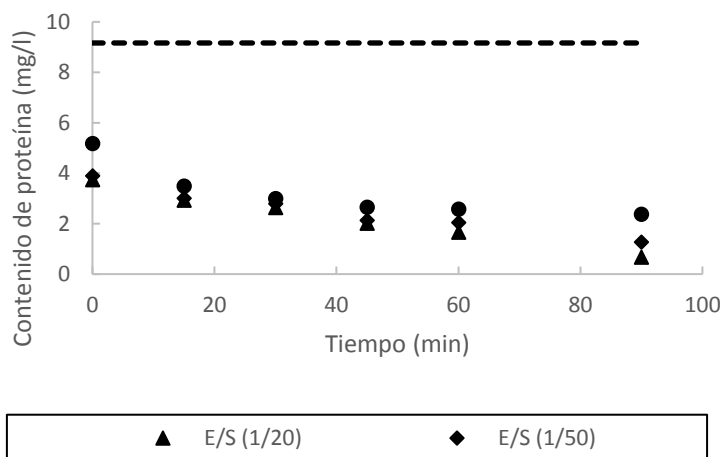


Figura 2. Contenido de proteína durante el tiempo de hidrólisis

En la Figura 2. se muestra la cinética del contenido de proteína del hígado de cerdo durante la hidrólisis. Se puede observar que el contenido de proteína total disminuye conforme al grado de hidrólisis. Igualmente se observa un efecto de la concentración de enzima sobre el contenido de proteína, está disminuye cuando la relación E/S incrementa.

Cinéticas del grado de hidrólisis

En la Figura 3 se muestran las cinéticas de la hidrólisis de extractos de hígado de cerdo a diferentes relaciones E/S. Se observa un incremento del porcentaje de hidrólisis con el aumento del tiempo de reacción. La concentración de enzima presenta un efecto sobre el grado de hidrólisis, en donde, a mayor concentración (mayor relación E/S) de enzima, se incrementa la hidrólisis. Al final de la hidrólisis (90 min) se obtuvieron valores alrededor de 10%, 25% y 35% de hidrólisis de proteína, para la relación E/S de 1/100, 1/50 y 1/20, respectivamente. Chou et al. 2014, obtuvieron resultados similares en el porcentaje de hidrólisis de hígado de pollo utilizando pesina en el tratamiento. Los autores reportaron valores al rededor de 16% de hidrólisis para una relación de E/S de 1/100.

De acuerdo a Benitez *et al.*, (2008), los productos alimentarios comerciales denominados “Hidrolizados” independiente del sustrato, presentan un grado de hidrólisis (DH) del 15 al 35% con respecto al sustrato inicial. Por lo anterior, la relación E/S de 1:20 a partir de los 15 minutos y hasta 90 minutos se obtiene un rango de DH similar al establecido. Para la relación E/S de 1:50 el valor mínimo de hidrolisis (15%) para su consideración como

hidrolizado es a partir de los 50 minutos aproximadamente, mientras que la relación 1:100 no permite la obtención del hidrolizado comercial en los primeros 90 minutos.

Con respecto al uso de hidrolizados, proteínas de huevo, de carne, de sangre, de vísceras e incluso de cereales se han empleados como sustratos para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes (Nissen y Olsen, 1979). Sin embargo, los hidrolizados de colágeno, gelatina y viseras han demostrado mejor potencial emulsificante (Bhaskar *et al.*, 2008;)

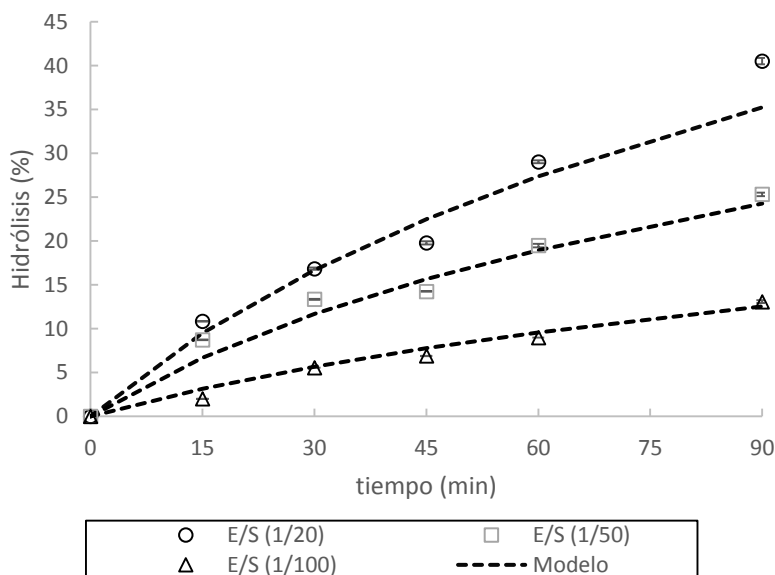


Figura 3. Cinéticas de la hidrólisis de proteína de hígado a diferentes relaciones E/S

Modelo matemático

A partir de la ecuación 2 se llevó a cabo el ajuste de parámetros a y b del modelo para cada concentración E/S, los cuales pueden ser observados en la tabla 2. El ajuste del modelo con respecto a los datos experimentales fue satisfactorio (Fig. 1), obteniéndose valores del porcentaje de varianza explicada (%Var) mayores a 0.97, así como valores del coeficiente de correlación (R^2) superiores a 0.95. Se puede observar un efecto de la relación E/S sobre los parámetros cinéticos del modelo, en donde incrementa el parámetro a con el aumento de la concentración de enzima, mientras que el parámetro b disminuye.

Tabla2. Parámetros cinéticos del modelo

Relación E/S	Parámetros del modelo			
	a	b	%Var	R^2
1/100	0.24	0.08	97.21	0.97
1/50	0.53	0.05	98.19	0.95
1/20	0.74	0.03	97.59	0.98

CONCLUSIÓN:

El contenido de proteína inicial de hígado de cerdo disminuyó cuando la relación E/S incrementó. Igualmente, el porcentaje de hidrólisis incrementó con el tiempo de reacción. La concentración de enzima presentó un efecto sobre el grado de hidrólisis, en donde, una mayor concentración de enzima, incrementó el porcentaje de hidrólisis. Los parámetros cinéticos fueron afectados por la relación de E/S. La relación E/S de 1:20 a partir de los 15 minutos y hasta

90 minutos de tratamiento obtuvo un rango de grado de hidrólisis comercial. El ajuste del modelo matemático a los datos experimentales fue satisfactorio, obteniéndose valores del porcentaje de varianza explicada (%Var) y del coeficiente de correlación (R^2) adecuados.

BIBLIOGRAFÍA:

- Adler-Nielsen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27, 1256-1262. Doi: 10.1021/jf60226a042.
- AOAC, 1997. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. 16th ed., 3rd revisión, Gaithersburg, USA.
- Benítez R., A Ibarz. y J Pagan. 2008, Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones, *Acta Bioquímica Clínica Latinoam*: 42(2), 227-3
- Carranza-Saavedra D, Méndez-Reyes D.A., Solanilla D. F. y Váquiro H. A., 2016. Modelamiento de la cinética enzimática para la obtención de hidrolizados de vísceras de pescado. *Agronomía Colombiana*. 34(1 supl.), S415-S418.
- Chou C. H., Wang S.Y., Lin Y.T., Chen Y.C. 2014. Antioxidant activities of chicken liver hydrolysates by pepsin treatment. *International Journal of Food Science and Technology* 2014, 49, 1654–1662
- Domínguez-Domínguez M.M, Álvarez-Castillo A., Castrejón-Rosales T., Granados-Baeza M.J. , Hernández-Campos F.J. , Alcalá-Octaviano V.H. , Tapia-Picazo J.C., 2011, Estudio de la cinética de la hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores, *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen* 12(3)
- Flemming, M. C. (1989). Enzyme technology versus engineering technology in the food industry. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 11, 249-265.
- Gómez L., Figueroa O. y Zapata J., 2012. Actividad Antioxidante de Hidrolizados Enzimáticos de Plasma Bovino Obtenidos por Efecto de Alcalasa® 2.4 L. *Información Tecnológica – Vol. 27 N° 2 2016*.
- Gómez L., Figueroa O. y Zapata J., 2016. Optimización de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas de Plasma Bovino. *Información Tecnológica Vol. 24 N° 1 – 2013*.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177, 751–766.
- Gottschik, W. (1994). The use of enzymes in food production. *Food Technology Europe* 2, 158-160.
- Hoyo-González M.P., 2012. Valorización de sangre de mataderos durante el desarrollo de nuevos materiales y productos, Tesis doctoral.
- Howell, N. K., & Lawrie, R. A. (1983). Functional aspects of blood plasma proteins. I. Separation and characterization. *Journal of Food Technology*, 18, 747–762.
- Hui-Chuan, Y., Fa-Jui T., 2017. Effect of ultrasonic pretreatment on the antioxidant properties of porcine liver protein hydrolysates, *International Journal of Food Science and Technology* 52, 1392–1399.
- Liu Q. y otros tres autores 2010, Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.013, *Food Chem*, (en línea), 118(2), 403–10
- Madrid, A. Aprovechamiento de los subproductos cárnicos. 1º Edición. Ediciones Mundi-Prensa. 1999.
- Obiro, W. C., Ray, S. S., & Emmambux, M. N. (2012). V-amylose structural característico, methods of preparation, significance, and potential applications. *Food Reviews International*, 28, 412–438.
- Sathe, S. K., & Salunkhe, D. K. (1981). Functional properties of the Great Northern Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: Emulsion, foaming, viscosity and gelation properties. *Journal of Food Science*, 46(7), 1–74.
- Van Kerrebroeck W. (2000) Technologie and Strategy for PH Liquid Buffer systems, recuperado de http://www.ph-liquid.com/_bufferPHvalues/spanish.html.
- Nielsen, P. M., Petersen, D. y Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66: 642–646.
- Adler-Nissen J, Olsen HS. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *ACS Symp Ser* 1979; 92: 125-46.

Bhaskar N, Benila T, Radha C, Lalitha RG. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Biores Technol* 2008; 99(2): 335-43. 9