

# Efecto del pH y la temperatura en la hidrólisis enzimática de subproductos de la industria bovina\*

Salazar-Posada, C.\*\*; López-Padilla, A.\*\*\*, Cano-Salazar, J. A. \*\*\*\*

## Resumen

**Introducción.** Debido a la gran cantidad de residuos que genera la industria ganadera en Colombia y a su alto porcentaje de proteína, se planteó un estudio que permita establecer una alternativa para el aprovechamiento de estos buscando dar un valor agregado y aliviar una carga ambiental. **Objetivo.** Evaluar el efecto del pH y la temperatura sobre las condiciones de hidrólisis enzimática de extracto de hueso de res. **Materiales y métodos.** Para el desarrollo de la investigación se utilizó un diseño central compuesto rotatable (DCCR), obteniendo un total de 10 experimentos para cada una de las enzimas de disponibilidad comercial Alcalase 2,4 L FG y Flavourzyme ®. **Resultados.** Se encontró que la temperatura tiene un efecto significativo ( $p=0,0065$ ) sobre el grado de hidrólisis en la enzima Alcalase, alcanzando su mayor grado de hidrólisis (8.21%) a 55°C y pH=5.79, mientras que para Flavourzyme se encontró que el pH tiene un efecto significativo ( $p=0,0157$ ) alcanzando un grado de hidrólisis de 20.23% a 45°C y pH=6,50. **Conclusión.** Es factible obtener productos de valor agregado como los hidrolizados enzimáticos a partir de sub-productos de la industria bovina con una amplia proyección industrial.

**Palabras clave:** hidrólisis, subproductos, hueso bovino, pH

## Effect of the pH and of the temperature on the enzymatic hydrolysis of by-products from bovine industries

### Abstract

**Introduction.** Given the great amount of waste generated by cattle industries in Colombia, and its

high content of protein, a study to establish an alternative to use such waste was proposed, aiming to provide added values and alleviate the environmental load. **Objective.** Evaluating the effects of pH and temperature on the enzymatic hydrolysis conditions of beef bones. **Materials and methods.** To develop the research work, arotatable central composite design (RCCD) was used, and 10 experiments were obtained for every enzyme commercially available - Alcalase 2,4 L FG and Flavourzyme ®. **Results.** Temperature has a significant effect ( $p=0,0065$ ) on the degree of hydrolysis of the Alcalase enzyme, reaching its highest hydrolysis degree (8.21%) at 55°C and pH=5.79, while in the case of Flavourzyme a significant effect of the pH was found ( $p=0,0157$ ) reaching a hydrolysis degree of 20.23% at 45°C and pH=6,50. **Conclusion.** It is possible to obtain added value products, such as the enzymatic hydrolyzed ones, from by-products generated by bovine industries, with a wide industrial projection..

**Key words:** hidrolisis, by-products, beef bones, pH

## Efeito do pH e a temperatura na hidrólise enzimática de subprodutos da indústria bovina

### Resumo

**Introdução.** Devido à grande quantidade de resíduos que gera a indústria de gado na Colômbia e a sua alta percentagem de proteína, propôs-se um estudo que permita estabelecer uma alternativa para o aproveitamento destes procurando dar um valor agregado e aliviar um ônus ambiental. **Objetivo.** Avaliar o efeito do PH e a temperatura sobre

\* Artículo producto de la investigación financiada por el SENA con el convenio 331 del año 2011, realizada por Tecnas S. A. y la Fundación INTAL en Colombia.

\*\* Ingeniero de alimentos, Investigador en Sabores Carnicos Tecnas S. A.

\*\*\* Ingeniero de alimentos, Magister en ciencias farmacéuticas y alimentarias, Investigador Tecnas S. A.

\*\*\*\* Ingeniero de alimentos, Ph.D., MSc., Ciencia y Tecnología de Alimentos Coordinador Científico-Técnico de Proyectos Fundación INTAL.

Correspondencia: Cano-Salazar, J. A., e-mail: cproyectos@fundacionintal.org

Artículo recibido: 16/06/2012; Artículo aprobado: 15/11/2012

as condições de hidrólises enzimática de extrato de osso de rês. **Materiais e métodos.** Para o desenvolvimento da investigação se utilizou um desenho central composto rotatório (DCCR), obtendo um total de 10 experimentos para cada uma das enzima de disponibilidade comercial Alcalase 2,4 L FG e Flavourzyme®. **Resultados.** Encontrou-se que a temperatura tem um efeito significativo ( $p=0,0065$ ) sobre o grau de hidrólise na enzima Alcalse, atingindo seu maior grau de hidrólise (8.21%) a 55°C

e  $\text{PH}=5.79$ , enquanto para Flavourzyme se encontrou que o PH tem um efeito significativo ( $p=0,0157$ ) atingindo um grau de hidrólise de 20.23% a 45°C e  $\text{PH}=6,50$ . **Conclusão.** É viável obter produtos de valor agregado como os hidrolisados enzimáticos a partir de sub-produtos da indústria bovina com uma ampla projeção industrial.

**Palavras importantes:** hidrólise, subprodutos, osso bovino, PH.

---

## Introducción

Con respecto al sacrificio de ganado, Colombia alcanza las 947 mil toneladas de carne de res en canal, es decir, 3,98 Millones de cabezas anuales. Teniendo en cuenta que del sacrificio de un bovino aproximadamente el 37,7% son residuos (cuero, cabeza, sangre, vísceras, patas y contenido digestivo), y de la canal obtenida el hueso constituye del 13 al 16%, es evidente que hay una gran cantidad de sub-productos generados. Los huesos, cabezas y vísceras son comúnmente utilizados para alimentación animal debido a su bajo valor comercial o, en el peor de los casos, destinados para ser incinerados o simplemente desechados, dando así un tratamiento inadecuado a estos residuos lo que causa problemas ambientales como la proliferación de plagas y malos olores. El hueso de la res tiene aproximadamente entre 17,6 y 19,9% de proteína con un contenido diverso de aminoácidos entre ellos cisteína, metionina y una cantidad considerable de ácido glutámico; es por ello que es válido pensar en el desarrollo de diversos productos con un alto valor agregado como bien lo son los obtenidos a partir de hidrolizados proteicos, que pueden ser funcionales como base para complementos nutricionales, alimentos para deportistas, entre otros.

La hidrólisis enzimática se ha utilizado para la modificación de las propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas de los alimentos. Estos cambios son convenientes cuando se quiere aumentar la incorporación de proteínas en formulaciones específicas. Este tipo de hidrólisis ha demostrado aumento de la solubilidad, las propiedades emulsificante y la liberación de péptidos biológicamente activos de ciertas proteínas.

El objeto de este trabajo de investigación fue determinar el efecto de la temperatura y el pH sobre el grado de hidrólisis, durante el proceso de hidrólisis enzimática de un extracto de hueso bovino proveniente de industrias ubicadas en Medellín, Colombia.

## Materiales y métodos

Enzimas y reactivos. Se emplearon dos enzimas de disponibilidad comercial Alcalase 2,4 L FG y Flavourzyme®, suministradas por Novozyme Latin America Ltda., Brasil. El pH fue ajustado con NaOH 2,0N y HCl 2,0N, para cada uno de los experimentos de hidrólisis.

Para cada prueba se utilizó un reactor de 2,0 L de volumen de trabajo con una agitación de 200 rpm y controlador térmico.

El estudio de la hidrólisis enzimática fue realizado ceñido a un diseño experimental central compuesto (DCCR)  $2^2$  con dos puntos centrales y cuatro puntos axiales, para un total de 10 experimentos para cada enzima. Las dos variables estudiadas fueron la temperatura con valores entre 45 y 65 °C y pH con valores entre 6 y 7 para cada enzima, con una relación enzima-sustrato (E/S) constante de 4,2% w/w, siguiendo lo propuesto por Kurozawa<sup>1</sup>.

El valor del grado de hidrólisis es uno de los indicadores más utilizados para comparar diferentes procesos de hidrólisis de proteínas<sup>2</sup> y su determinación mediante método pH-Stat que fue descrita por Adler-Nissen en 1986<sup>3</sup>, relacionando así el consumo de NaOH durante la neutralización del medio con la acidez provocada por la liberación de aminoácidos tras la ruptura de las proteínas implícitas en la matriz cárnica.

## Proceso de hidrólisis

El residuo de res fue previamente descongelado y pesado; luego, el hueso fue suspendido en una relación 1:1 (w/w) en agua y sometido a tratamiento térmico a una temperatura de 85 °C durante 15 minutos con agitación, con el fin de que las proteínas se desnaturalizaran para facilitar el ataque enzimático y fundir la grasa la cual debe ser retirada en su mayoría para evitar interferencia de esta con los agentes neutralizantes durante el proceso.

Para el seguimiento del grado de hidrólisis, se utilizó el método pH-stat donde el consumo de NaOH fue medido en intervalos de 5 minutos en la primera hora, 10 minutos en la segunda y 15 minutos durante el tiempo restante, obteniendo así un valor de grado de hidrólisis (*GH*) que se definió como el porcentaje de la relación entre el número de péptido rotos (*h*) y el número total de enlaces disponibles para hi-

drólisis proteolítica (*h* total) que será calculado con la siguiente ecuación 1.

Donde:  $V_{NaOH}$  es el volumen de NaOH total consumido expresado en mL para mantener el pH constante durante la reacción;  $N_b$  es la normalidad de la base;  $MP$  es la masa de la proteína (g,  $N \times 6,5$ );  $h$  total es el número total de enlaces de péptidos en el sustrato de la proteína (7.6 mEq/ g proteína);  $\alpha$  es el grado de disociación de la proteína expresada según la ecuación 2.

El valor de  $pK$  varía de forma significativa con temperatura y puede estimarse así<sup>4</sup>, ecuación 3.

Posteriormente al proceso de hidrólisis, la enzima fue inactivada para dar por concluida la reacción; para ello se sometió el sistema a calentamiento a  $85 \pm 0,3$  °C durante 10 minutos, seguido de un enfriamiento a temperatura ambiente.

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{Total}} \times 100 = \frac{V_{NaOH} * N_b}{MP * \alpha * h_{Total}} \times 100 \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (2)$$

Donde  $T$  es la temperatura constante en Kelvin ( $K$ )

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (3)$$

## Resultados y discusión

En la tabla 1 se observa el diseño experimental propuesto (DCCR) y los resultados obtenidos para cada tratamiento de hidrólisis enzimática para la enzima comercial Alcalase 2,4 L FG.

El resultado de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre el grado de hidrólisis (%) y un modelo de superficie de respuesta cuadrático se puede ver en la ecuación 4:

$$GH(\%) = 0.994662 * T(^{\circ}C) - 3.18599 * pH - 0.00958509 * T(^{\circ}C)^2 \quad (4)$$

$$R^2 = 0,9216$$

Donde:  $GH$  (%) es el porcentaje del grado de hidrólisis y  $T$  y  $pH$  los valores para la temperatura y el  $pH$  respectivamente.

es la temperatura; su valor positivo indica que al incrementarse se estaría incrementando el  $GH$ ; esto corrobora lo expuesto por otros autores.

El parámetro lineal más importante que influencia el  $GH$  en el proceso con la enzima Alcalase

Los valores hallados en este estudio para la enzima Alcalase son menores a los reportados

por autores como Shahid y Naczk en 1995<sup>5</sup>, quienes emplearon un método de superficies de respuesta para estudiar el fenómeno, y reportaron un *GH* de 22% a 60°C en la hidrólisis enzimática de residuos de Capelin (*Mollotus villosus*); sin embargo, al evaluar los productos obtenidos, el que dió el 12% presentó las mejores propiedades funcionales y nutricionales, lo cual indica que un elevado *GH* no proporciona las mejores propiedades tecnológicas o nutricionales.

Gbogouri et al.<sup>6</sup> realizaron la hidrólisis enzimática de cabezas de salmón con Alcalase 2,4L, y evaluaron el efecto de la temperatura y el pH sobre el *GH* mediante superficie de respuesta, donde reportaron valores de *GH* superiores a los hallados en este estudio (11,5 – 17,3%) a

temperaturas 55 – 61°C y pH 7,0 – 8,0 y un  $R^2=0,91$ . En este trabajo se alcanzó un *GH* con Alcalase de 8,21 y un  $R^2=0,9216$  lo cual indica una fuerte explicación del fenómeno a través del modelo de regresión obtenido.

Sathivel et al.<sup>7</sup> encontraron valores de *GH* mayores a 15% empleando Alcalase en la hidrólisis enzimática de cabezas de salmón rojo (*Onchorhynchus nerka*); Ovissipour et al.<sup>8</sup> alcanzaron un *GH* de 16% a 55°C con Alcalase en la hidrólisis de cabezas de atún (*Thunnus olbacens*), valores superiores a los hallados en este estudio.

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95.0%, como se expresa en la tabla 2.

**Tabla 1. Resultado del grado de hidrólisis (%) en función de la temperatura y el pH para la enzima Alcalase 2,4 L FG**

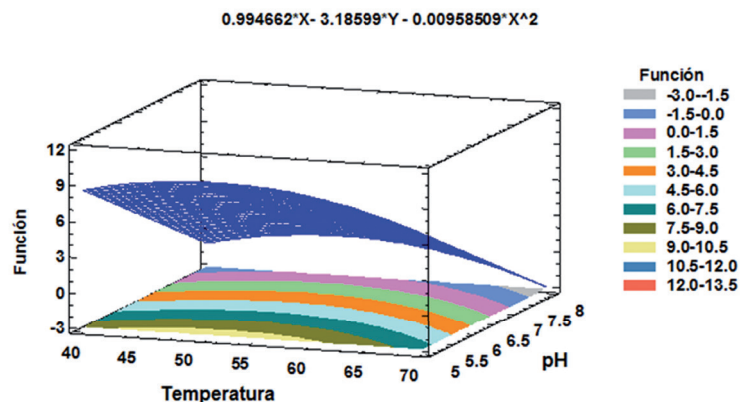
Alcalase 2,4 L FG				
Temperatura °C	T	pH	pH	Grado de Hidrólisis %
69.14	+α	6.50	0	2.28
45.00	-1	7.00	1	2.33
55.00	0	6.50	0	1.52
65.00	1	7.00	1	1.56
45.00	-1	6.00	-1	6.07
65.00	1	6.00	-1	5.51
40.86	-α	6.50	0	4.88
55.00	0	6.50	0	5.79
55.00	0	5.79	-α	8.21
55.00	0	7.21	+α	4.25

**Tabla 2. Resultado de la tabla ANOVA para la enzima Alcalase 2,4 L FG**

Parámetro	Estimación	Error		Valor-P
		Estándar	Estadístico T	
Temperatura °C	0.994662	0.260247	3.82199	0.0065
pH	-3.18599	1.05526	-3.01915	0.0194
Temperatura	-0.009585	0.0025029	-3.82963	0.0065

La temperatura resultó ser el factor más significativo ( $p=0,0065$ ) para la obtención del *GH*. En este proceso de hidrólisis se encontró que a una temperatura de 55°C y un pH de 5.79

se obtiene el mayor grado de hidrólisis para la enzima Alcalase 2,4 L FG, tal cual como se visualiza en la figura 1.



**Figura 1. Gráfico de superficie de respuesta para la función del grado de la actividad para la enzima Alcalase 2,4 L FG en función de la temperatura y el pH**

Por otro lado, en la tabla 3 se expresa el diseño experimental y los resultados obtenidos tras

cada tratamiento de hidrólisis enzimática para la encima de nombre comercial Flavorzyme.

**Tabla 3. Resultado del grado de hidrólisis (%) en función de la temperatura y el pH para la enzima Flavorzyme**

Flavorzyme				
Temperatura °C	T	pH	pH	Grado de Hidrólisis %
45.00	-1	7.00	1	4.85
55.00	0	7.21	+α	3.12
55.00	0	6.50	0	4.57
65.00	1	7.00	1	2.52
40.86	-α	6.50	0	4.02
55.00	0	5.79	-α	8.21
65.00	1	6.00	-1	7.35
55.00	0	6.50	0	4.11
45.00	-1	6.00	-1	20.23
69.14	+α	6.50	0	0.93

Ajustando el resultado a un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación

entre grado de hidrólisis y % en el modelo de superficie se obtiene la ecuación 5:

$$GH(\%) = 10.6943 * pH - 0.00223114 * T(^{\circ}C)^2 - 1.33335 * pH^2(5)$$

$$R^2 = 0,7919$$

Donde GH (%) es el porcentaje del grado de hidrólisis y T y pH los valores para la temperatura y el pH, respectivamente

la hidrólisis enzimática de cabezas de salmón rojo, donde emplearon la enzima Flavourzyme® y obtuvieron valores de mayores a 9%; sin embargo, son menores a los hallados por Ovissipour et al.<sup>8</sup> y Nilsang et al.<sup>9</sup> donde lograron alcanzar valores de GH de 46,13% a 55°C

Los resultados obtenidos en este estudio son superiores a los reportados por Sathivel et al.<sup>7</sup>

y GH mayor a 50% a 45°C, respectivamente. Este último trabajo se realizó sobre un concentrado soluble de pescado procedente del procesamiento del atún.

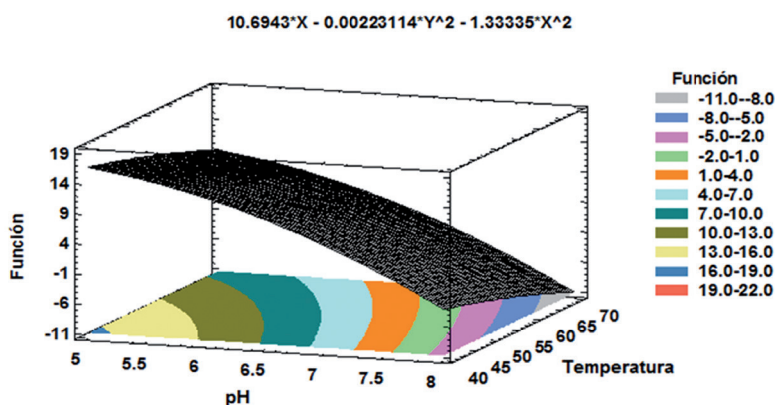
Como el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables con un nivel de confianza del 95.0% tal cual como se expresa en la tabla 4.

**Tabla 4. Resultado de la tabla ANOVA para la enzima Flavorzyme**

Parámetro	Estimación	Error Estándar	Estadístico	
			T	Valor-P
pH	10.6943	3.37264	3.1709	0.0157
Temperatura °C <sup>2</sup>	-0.002231	0.0013819	-1.6145	0.1505
pH <sup>2</sup>	-1.33335	0.482313	-2.7645	0.0279

Como se observa en la figura 2, se encontró que a una temperatura de 45°C y un pH de 6 se obtiene el mayor grado de hidrólisis para la

enzima Flavorzyme; el GH (%) es mucho mayor para esta enzima, en mención que para la Alcalase 2,4 L FG casi que dobla su valor.



**Figura 2. Gráfico de superficie de respuesta para la función del grado de la actividad para la enzima Flavorzyme en función de la temperatura y el pH**

Para la enzima Flavorzyme el grado de hidrólisis (%) más alto, durante los experimentos, fue de 20.23% a condiciones de T (°C) de 45°C y un pH de 6.

Según Stanciuc et al.<sup>10</sup> y Kurozawa et al.<sup>11</sup>, la hidrólisis enzimática se lleva a cabo en condiciones suaves de temperatura (40 - 60°C) y pH (6 - 8), lo que permite visualizar que los resultados obtenidos están acordes con los rangos normalmente establecidos para este tipo de procesos.

Según Pagan, Ibarz y Benítez<sup>12</sup> se obtienen valores de 15 y 20 por ciento en investiga-

ciones previas de la hidrólisis enzimática de proteína de hueso de cerdo, lo que indica que los resultados hallados son apropiados para este tipo de matriz, y ajustables a la enzima Flavorzyme® en la hidrólisis de proteína de hueso de res.

## Conclusiones

Es posible realizar un hidrolizado proteico a partir de hueso de res, subproducto generado por el repele de las canales en de la industria bovina.

La evaluación de pH y temperatura permitió acercarnos a las regiones óptimas de hidrólisis enzimática para las enzimas de carácter comercial Alcalase 2.4 L FG y Flavorzyme lo que ayudaría a una posterior optimización del proceso para la obtención de péptidos y aminoácidos libres que podrían ser un aporte importante para el desarrollo de productos con valor nutricional apreciable y un valor agregado considerable, debido a su contribución al manejo de residuos agroindustriales.

A pesar de que no hay estudios reportados en el tipo de matriz trabajada, los porcentajes de grado de hidrólisis obtenidos son adecuados tomando como base de comparación los resultados obtenidos con otros autores.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al SENA por la financiación del proyecto de investigación con el convenio 331 del año 2011, a Tecnas S. A., Fundación INTAL en Colombia y al Departamento de tecnología de alimentos, Universidad de Lleida – España y a todo el recurso humano involucrado en la realización de este proyecto.

## Referencias bibliográficas

1. KUROZAWA L. E. Palestra hidrolise. Curso internacional de hidrólisis enzimática, Fundación INTAL. 2011
2. BOUGATEF, A.; et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chem.* 2010. Vol. 118, N° 3, p. 559-565.
3. ADLER- NISSEN, J. *Enzymic hydrolysis of food protein.* London: Elsevier Applied Science, 1985. 427 p.
4. KRISTINSSON H. G. y RASCO B. A. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmosalar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *En: Process Biochemistry (Oxford).* 2000. Vol. 36, N° 1-2, p. 131-139.
5. SHAHIDI, F. & NACZK, M. *Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications.* Lancaster, PA, USA: Technomic Publishing Company Inc. 1995.
6. GBOGOURI, G. A.; et al. Influence of hydrolysis degree o the functional properties of salmon by products hydrolysates. *En: Food Chemistry and Toxicology.* 2004. Vol. 69, N° 8, p. 615-622.
7. SATHIVEL, S.; et al. Functional and nutritional properties of red salmon (*Onchorhynchus nerka*) Enzymatic hydrolysates. *En: Food Chemistry and Toxicology.* 2005. Vol. 70, N° 6, p. 401-406.
8. OVISSIPOUR, M.; et al. The effect of enzymatic hdrolysis time and temperatura on the properties of protein hydrolysates from persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *En: Food Chemistry.* 2000. Vol. 115, p. 238-242.
9. NILSANG, S.; et al. Optimization of enzymatica hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *En: Journal of food Engineering.* October 2005. Vol. 70, N° 4, p. 571–578. Doi: 10.1016/j.foodeng.2004.10.011.
10. STANCIUC, Nicoleta; et al. Thermal treatment can modify the susceptibility of whey protein concentrate to enzymatic hydrolysis. Galati, România: Department of Bioengineering, Faculty of Food Science and Engineering, University, Domneasca, 2010
11. KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J. & HUBINGER M.D. Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Chiken Meat Using Response Surface Methodology. *En: J Food Sci.* Jun 2008. Vol. 73, N°5, 2008. p. C405–C412.
12. BENÍTEZ, Ricardo, IBARZ, Albert y PAGAN, Jordi. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *En: Acta bioquím. clín. latinoam.* 2008. Vol.42, N° 2, p. 227-236.