



Universidad Autónoma del Estado de México.



Facultad de Química.

Programa de Doctorado en Ciencias Químicas

Proyecto de investigación

Efecto de hidrolizados de *Dosidicus gigas* con propiedades bioactivas sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas de un embutido de calamar gigante durante su vida útil

Presenta: M. en C. Q. Francisco Antonio López Medina

Dirigido por:

Dr. Octavio Dublán García

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Dra. Leticia Xochitl López Martínez

Toluca Estado de México, Julio 2022

Resumen

Los productos de hidrólisis de proteínas de pescado por determinados microorganismos han presentado actividades biológicas de interés, se estudiaron las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y funcionales de hidrolizados obtenidos por fermentación sumergida con *Bacillus subtilis* ATCC 6633, utilizando manto de calamar gigante congelado por 20 meses a -20°C como sustrato. Medios de cultivo con diferentes proporciones de colágeno:músculo (C0=100% músculo, C25=75% músculo+25% colágeno, C50=50% músculo + 25% colágeno, C75=25% músculo +75% colágeno, C100=100% colágeno) de calamar gigante se sometieron a fermentación de 0 a 8 horas. La capacidad de captura de radicales libres se probó con la metodología ABTS^{•+} (valor óptimo para 8 horas de fermentación, 4.6% de colágeno) y DPPH• (valor óptimo para 8 horas de fermentación, 100% de colágeno). Se encontraron halos de inhibición entre 6 mm y 12.5 mm en hidrolizados para bacterias Gram negativas y de 6.2 mm a 12.1 mm para *S. aureus*. En la espectroscopia de infrarrojo después de 8 horas de fermentación se detectaron picos que sugieren la presencia de anillos aromáticos (1582 cm^{-1} , 856 cm^{-1} y 756 cm^{-1}) además de picos que suponen la presencia de surfactante de *Bacillus subtilis* (1510 cm^{-1} , 1392 cm^{-1} y 1198 cm^{-1}). Se tuvo un máximo de 150% (v/v) en la capacidad de formación de espuma con 2h-C100 y un 87.5% (v/v) con 8h-C50; para estabildades de espuma un 77.5% (v/v) con 2h-C100 y 22.5% (v/v) con 0h-C0. El valor máximo para el índice de actividad emulsionante fue de $1778.06 \pm 30.85\text{ m}^2/\text{g}$ de proteína para 8h-C0, mientras que el mayor índice de estabilidad emulsionante fue $82.04 \pm 2.81\text{ min}$ para 8h-C25. La actividad de proteasas presentes en los hidrolizados disminuyó la dureza de geles de grenetina hasta un 29.6%. Así mismo, en el estudio se determinó el efecto de la adición de hidrolizados de calamar gigante obtenidos por fermentación con *Bacillus subtilis*, con capacidad antioxidante y antimicrobiana *in vitro*, sobre las propiedades de un embutido de calamar gigante almacenado a 4°C por 43 días. La vida útil de los embutidos se evaluó determinando las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas, al adicionar los hidrolizados se observó reducción del deterioro microbiano (CTV: control= 4.23 Log UFC/g, hidrolizado= 2.38 Log UFC/g; CBP: control= 4.13 Log UFC/g, hidrolizado= 2.36 Log UFC/g, al día 22 de almacenamiento; para la muestra con hidrolizado al día 43 de almacenamiento CTV= 3.69 Log UFC/g, CBP= 3.79 Log UFC/g), disminución en la generación de bases volátiles totales (control: 52.2 mg N/100g, hidrolizado: 33.6 mg N/100g, al día 22 de almacenamiento; para la muestra con hidrolizado al día 43 de almacenamiento 57.69 mg N/100g) y retraso en el pardeamiento (control: $L^*=72.8$ $b^*=35.1$, hidrolizado $L^*=73.1$ $b^*=34.6$, al día 22 de almacenamiento; para la muestra con hidrolizado al día 43 de almacenamiento $L^*= 72.9$ $b^*= 35.2$), prolongando la vida de anaquel de 22 a 43 días.

Estos resultados muestran que el empleo de calamar gigante almacenado por largos periodos de tiempo en congelación como sustrato, evitando su desperdicio y efectos nocivos al ambiente, permite la obtención de hidrolizados con capacidades antioxidantes, antimicrobianas y funcionales, por lo que el proceso de fermentación sumergida con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 es apto para la obtención de péptidos bioactivos los cuales pueden contemplarse para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica, de igual manera, la adición de estos hidrolizados en alimentos podría ser aplicado como coadyuvante para tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, convirtiéndolos en alimentos funcionales.

1. Antecedentes

1.1. Proteína de pescado como materia prima para la obtención de hidrolizados y péptidos bioactivos

1.1.1. Industria de pescado y generación de subproductos

La producción de pescado se ha incrementado en años recientes, al igual que el consumo de pescado. Esto ha derivado en el incremento de residuos de pescado, los cuales en la mayoría de los casos son descartados directamente sin tomar ventaja de ellos, representando un problema ambiental y económico que puede afectar la viabilidad de la industria de acuicultura y pesca. Por lo que es necesario dar una segunda oportunidad a estos residuos para que sea posible reducir la contaminación y mejorar la eficiencia de la industria de pescado (Marti-Quijal *et al.*, 2020).

De acuerdo con Mirzapour-Kouhdasht *et al.* (2021), más del 50% de biomasa derivada del procesamiento de pescado es descartada como desperdicio cada año. Esto también puede representar un problema serio para el ambiente. Sin embargo, estos subproductos pueden ser procesados en compuestos de alto valor como proteínas, aminoácidos y péptidos bioactivos.

1.1.1.1. Industria del calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

La pesca de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) en México comenzó en 1974 de forma artesanal y posteriormente fue transformándose a pesca industrial, por lo que en la actualidad resulta de gran importancia en esa región. La pesca de *D. gigas* se realiza en el golfo de California, en la zona comprendida entre Santa Rosalía-Baja California Sur y Guaymas-Sonora hasta la boca del golfo. México es uno de los principales países en el mundo en el que se capturan *D. gigas*; 15% de la captura total de acuerdo con la FAO. La captura de calamar gigante entre 2003 y 2010 representó un 4.5 % del total de las capturas en México, concentrándose principalmente en el estado de Baja California Sur con más del 55 % de las capturas mientras que el resto de las capturas ocurrió en los estados de Sonora, Baja California y Sinaloa. Por lo

anterior, la captura de *D. gigas* genera una gran cantidad de empleos tanto directos (3000 y 3500) como indirectos, por lo tanto, es considerada una pesquería rentable. Por otro lado, las unidades de mortalidad por pesca, tasa de explotación, magnitud de reclutamiento y el escape proporcional, indican que la captura de calamar no está sobreexplotada debido a que está por debajo de los niveles óptimos. (INAPESCA, 2019)

En general se aprovecha el 75 % del calamar sin vísceras, y al ser un alimento de origen marino su valor nutrimental se considera como bueno; destaca el contenido de proteínas (53 %) de fácil digestión (digestibilidad = 94 %), carbohidratos no asimilables, vitaminas A, D y complejo B, bajo contenido graso y calórico. Existe información sobre la ecología, biología, reproducción y distribución del calamar gigante (*Dosidicus gigas*); así como de la composición química del calamar entero fresco con una humedad de 82.23 %, proteína cruda 15.32 %, cenizas 1.31 % y grasa 0.87 %; en harina se reporta un contenido de proteína cruda 77.76 %, cenizas 8.54 % y grasa 6.33 % (Carranco-Jáuregui *et al.*, 2020)

Uno de los principales retos al emplear el calamar gigante como parte de un producto es la alta actividad enzimática que posee (enzimas endógenas y microbianas) que genera una rápida degradación proteica y por consecuencia, un descenso en las propiedades funcionales en el aspecto estructural que aportaría a un producto. Dadas estas condiciones, el empleo de calamar gigante en un producto cárnico representaría algunas desventajas, ya que la población en general tiende a relacionar una textura firme con productos cárnicos de buena calidad. Además, debido al tiempo que transcurre entre la captura del molusco y su llegada al mercado, se produce una pérdida rápida de la calidad textural post-mortem. Si bien, la especie es apta para su almacenamiento en condiciones de congelación (<-20°C), lográndose una vida útil superior a 14 meses, el almacenamiento por periodos mayores produce un cambio en las características texturales que lo hace poco deseable (Blanco-Pascual *et al.*, 2014).

1.1.2. Potencial nutricional y funcional de subproductos de pescado

Los subproductos son obtenidos como resultado del procesamiento de pescado a nivel industrial, provengan de pesca o acuicultura. Estos subproductos representan alrededor del 60% del total del peso del pescado después del procesamiento industrial, aunque difiere de acuerdo con las especies.

De estos subproductos obtenidos después del procesamiento de pescado, se pueden recuperar una gran cantidad de compuestos de alta calidad y utilizarse para consumo humano. Entre estos compuestos, proteína, aminoácidos, aceite, hidroxapatita, enzimas, colágeno y gelatina tienen un gran valor agregado, por lo que su estudio es de gran interés para valorizar los residuos de pescado (Marti-Quijal *et al.*, 2020).

Los subproductos de pescado actualmente son utilizados para la producción de aceite y alimento animal. Como es conocido, el pescado es una fuente rica en aceites omega 3, siendo el hígado el órgano principal donde los lípidos son acumulados, aunque también puede encontrarse en otros subproductos como la piel o cabeza. El colágeno es otro componente importante que es viable para obtener de residuos de pescado y es utilizado en diversas áreas como cosméticos, alimentos o la industria farmacéutica; el colágeno se obtiene principalmente de la piel, y en menor proporción de espinas y aletas. Adicionalmente existen otros usos para subproductos de pescado, como biocombustibles o fertilizantes, los cuales, aunque no son tan comunes como la alimentación animal u obtención de aceite, son una parte importante de la industria dedicada a la valorización de subproductos de pescado (Marti-Quijal *et al.*, 2020).

1.1.3. Producción de hidrolizados y péptidos bioactivos

Péptidos bioactivos son considerados aquellos fragmentos de proteínas que, al sufrir tratamientos de digestión empleando enzimas proteolíticas específicas o fermentación, imparten funciones positivas o efectos benéficos que influyen en la salud humana.

Los métodos para el estudio de péptidos bioactivos son variados, muchos de los cuales implican metodologías *in vitro* para demostrar actividad biológica. La generación e identificación de péptidos bioactivos se ha llevado a cabo de diversas formas. Los péptidos se han producido *in vitro* a través de hidrólisis utilizando enzimas digestivas o han sido aislados y caracterizados (Shahidi & Zong, 2008).

1.2. Métodos de obtención de hidrolizados de proteína a partir de residuos de pescado

A menudo, se han sintetizado péptidos para utilizarse en estudios *in vitro*. En muchos casos, los péptidos han sido identificados basados en la comparación de secuencias con aquellos de conocida actividad biológica, por ejemplo, péptidos opioides (Pihlanto-Leppälä *et al.*, 2000). Otros métodos se basan en técnicas de procesamiento de alimentos, como el uso de temperatura, cambios de pH o la habilidad de enzimas microbianas para hidrolizar proteínas, por ejemplo, durante fermentaciones (Rutherford-Markwick & Moughan, 2005).

Tecnologías que involucran procesamiento de alimentos como uso de temperatura, modificación de pH o la habilidad de enzimas microbianas para hidrolizar proteínas pueden ser utilizadas para la generación de biopéptidos. La adición de grupos funcionales a los péptidos para mejorar la funcionalidad como modificación química ha sido puesta en práctica, desde los péptidos derivados de caseína que fueron fosforilados, los caseinfosfopéptidos, para mejorar la absorción de calcio en infantes (Kannan *et al.*, 2012).

1.2.1. Fermentación

La fermentación es una técnica segura, amigable con el medio ambiente y rentable, la cual permite obtener una gran variedad de compuestos, siendo algunos de ellos péptidos bioactivos o compuestos aromáticos. Hasta ahora, el método elegido por la industria para la obtención de péptidos ha sido el uso de ácidos o bases para promover la hidrólisis de proteínas, principalmente por ser un proceso simple y de bajo costo. Sin embargo, el uso de la fermentación puede

proveer diferentes beneficios respecto a la hidrólisis asistida por cambios de pH. Como algunos de los principales beneficios cabe resaltar el incremento en la efectividad de péptidos antioxidantes. Adicionalmente, la fermentación produce proteínas más digeribles, debido a la hidrólisis y degradación en péptidos más cortos y aminoácidos, por lo que puede ser una herramienta útil para mejorar la calidad en productos de pescado (Marti-Quijal *et al.*, 2020).

1.2.1.1. Tipos de fermentación

Este proceso permite recuperar ingredientes de alto valor de subproductos, usados como fuente natural de compuestos biológicamente activos para el uso como medicamentos y en la formulación de alimentos funcionales. De acuerdo con el tipo de sustrato y el objetivo de la fermentación, es posible distinguir dos grandes clasificaciones de fermentaciones, fermentaciones sumergidas (FS) y fermentaciones en estado sólido (FES). Las FS son útiles para procesos batch o de una etapa, ya que se adicionan el sustrato y el microorganismo productor al inicio del proceso, y posteriormente separan al finalizar, además de su simplicidad, se ha reportado que mejora la transferencia de masa y reduce la posible inhibición por el sustrato. Las FES son útiles en procesos continuos y de batch alimentado, ya que los microorganismos crecen en un soporte sólido, son inmovilizados y reutilizados por varios ciclos logrando una mayor eficiencia (Sabater *et al.*, 2020).

1.2.1.2. Microorganismos específicos

Existe una gran diversidad de microorganismos utilizados en procesos de fermentación, entre ellos los géneros *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Rhizopus spp.*, y *Saccharomyces spp.* (Hajfathalian *et al.*, 2017)

1.3. Propiedades de hidrolizados de proteínas de pescado

1.3.1. Bioactividad *in vitro*

Péptidos bioactivos que han demostrado efectos benéficos sobre la salud humana se han localizado en alimentos de origen marino. Péptidos bioactivos mostrando actividades: antihipertensiva, antioxidante, hipocolesterolémica y de inhibición de α -glucosidasa se han encontrado en digestiones enzimáticas de proteínas de organismos marinos.

1.3.1.1. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de hidrolizados generados a partir de proteína de pescado es afectada por diversos factores, entre los cuales se encuentran la especificidad de la proteasa utilizada y el grado de hidrólisis de la proteína, ya que esto impacta en el peso molecular, secuencia de aminoácidos, hidrofobicidad y carga de los péptidos producidos. Péptidos entre 500 y 1500 Da tienen una mayor actividad antioxidante respecto a otros péptidos, además la presencia de aminoácidos hidrofóbicos facilita la captura de radicales libres y la capacidad de quelación de metales, mientras que los aminoácidos aromáticos también contribuyen al incremento en la capacidad de capturar radicales libres (Gao *et al.*, 2021).

1.3.1.2. Capacidad antimicrobiana

Péptidos con propiedades antimicrobianas han sido identificados en una gran variedad de fuentes naturales. Los péptidos antimicrobianos exhiben efectos inhibitorios contra microorganismos causantes de la invasión y deterioro de alimentos, incluyendo un amplio rango de patógenos in vivo, como bacterias, hongos y virus, al igual que parásitos. La acción y efectividad de estos péptidos biológicamente activos varía dependiendo de las características estructurales, como son el tamaño del péptido, la composición de aminoácidos, la carga, hidrofobicidad y estructura secundaria (Kannan *et al.*, 2012). Más aún, éstos muestran una variada selectividad y sensibilidad sobre los microorganismos diana.

La mayoría de los péptidos antimicrobianos poseen características en común independientemente de la fuente de origen. Usualmente están compuestos por menos de 50 aminoácidos de los cuales aproximadamente el 50% son aminoácidos hidrofóbicos, y se conforman espacialmente en una estructura 3D anfipática (Ryldo et al., 2006). Teniendo un exceso de aminoácidos básicos (lisina y arginina), los péptidos antimicrobianos poseen una carga neta positiva. Tener naturaleza catiónica y anfipática son dos características estructurales importantes para la actividad antimicrobiana.

Péptidos bioactivos con propiedades antimicrobianas como aquellos producidos por bacterias ácido-lácticas en alimentos fermentados y varios péptidos de obtenidos de alimentos son buenos candidatos como aditivos alimentarios. Las ventajas de péptidos antimicrobianos sobre conservadores químicos incluyen una menor cantidad de efectos adversos introducidos, disminución en la intensidad de tratamiento térmico requerido (mínimo procesamiento) y la retención de propiedades nutrimentales y organolépticas, como menor acidificación o menor contenido de sal (Galvez et al., 2007). En aplicaciones terapéuticas, los péptidos antimicrobianos son superiores a los bactericidas convencionales ya que matan rápidamente a las bacterias y no son afectados por mecanismos de resistencia a antibióticos que usualmente sucede con otros antibióticos (Ryldo et al., 2006).

La actividad antimicrobiana de bacteriocinas contra microorganismos patógenos ha sido elucidada a niveles celular y molecular. La inhibición se ha asociado con la interacción de péptidos con la membrana y otros componentes celulares. Algunas bacteriocinas expresan su efecto letal sobre el microorganismo diana desintegrando la pared celular, incrementando la permeabilidad de ésta y facilitando el flujo de moléculas pequeñas como aminoácidos y adenosina trifosfato (Nagao et al., 2006). Los péptidos antimicrobianos cargados positivamente atraviesan las barreras cargadas negativamente (la parte externa de la pared celular de

Gram negativas, que contiene lipopolisacáridos; la parte externa de la pared celular de Gram positivas, que contiene polisacáridos) desplazando competitivamente a los cationes divalentes que unen y neutralizan los polisacáridos (Chan & Li-Chan, 2006). En concentraciones bajas de péptidos, esto conlleva a la ruptura de la célula, mientras que a altas concentraciones de péptidos las bacterias tienden a lisarse parcialmente y desintegrarse. Adicionalmente a la interacción con la membrana celular, las bacteriocinas y otros péptidos antimicrobianos, exhiben un efecto inhibitorio sobre ciertos microorganismos a través de la interacción con componentes intracelulares aniónicos como ADN y ARN, probablemente inhibiendo la síntesis de proteínas y la división celular (Cudic & Otvos, 2002).

1.4. Aplicación de hidrolizados de proteína y péptidos bioactivos

Existe una gran diversidad de compuestos obtenidos vía fermentación con aplicaciones en las industrias alimenticia, farmacéutica, cosmética, agroalimentaria, de plásticos, entre otras (Marti-Quijal *et al.*, 2020).

En alimentación, los hidrolizados de proteína de pescado se han utilizado en fortificación de bebidas, enriquecimiento de galletas, fortificación de pan y fortificación de helado, para incrementar el valor proteico de estos alimentos. En agricultura, se ha utilizado como suplemento en alimentación de animales. Para uso microbiano en laboratorio, se han utilizado como fuente de nitrógeno en medios de cultivo. En estudios clínicos, se ha demostrado su habilidad para reducir la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama. Como ingrediente nutracéutico, se ha aplicado en jugos de frutas como fortificante de calcio para pacientes con intolerancia a la lactosa. Con la tendencia global en el incremento de la demanda de alimentos saludables, se espera el desarrollo de más productos que promuevan la salud y la prevención de enfermedades, desarrollados a partir de hidrolizados de proteína de pescado (Idowu *et al.*, 2021).

2. Justificación

La captura, consumo y utilización tecnológica de especies cárnicas acuícolas y marinas, como el calamar gigante (*Dosidicus gigas*), requieren procesos de almacenamiento a bajas temperaturas, en camas de hielo post-captura o incluso almacenamiento durante periodos prolongados en congelación (> 14 meses) y que, por dicho motivo, puede perder las características óptimas para el consumo humano. Como consecuencia, puede ser destinado a productos para alimentación animal o desechado directamente, generando contaminación en el ambiente.

Investigaciones recientes han demostrado que los productos de hidrólisis de músculo y colágeno de diversas especies, entre ellas el calamar gigante, pueden tener efectos positivos sobre la salud del consumidor, además, pueden coadyuvar a mantener ciertas propiedades y características de los alimentos a los cuales son adicionados, durante la vida de anaquel.

Dentro de los procesos para obtención de hidrolizados de músculo y colágeno de especies acuícolas y marinas, se encuentran los procesos de fermentación directa, en los cuales se pueden emplear probióticos, como *Bacillus subtilis*, para cumplir la función de producción de proteasas, además de producción de metabolitos con capacidad antioxidante y antimicrobiana.

Para la aplicación de dichos hidrolizados, se han empleado alimentos prototipo como vehículos, en los cuales se evalúan características relacionadas con la calidad del producto durante su vida útil, con el objetivo de observar si los hidrolizados coadyuvan a mantener sus características durante el almacenamiento.

Por ello, nuestro objetivo fue desarrollar un proceso de hidrólisis para manto de calamar gigante (músculo y colágeno) almacenado durante 20 meses en condiciones de congelación, utilizando el probiótico *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como organismo fermentador, y evaluar el efecto que tienen los hidrolizados obtenidos sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas de un embutido (alimento vehículo) de calamar gigante durante su vida útil.

3. Hipótesis

Hidrolizados de *Dosidicus gigas* tendrán propiedades bioactivas que coadyuvarán a mantener por más tiempo las características funcionales de un embutido cárnico a base de calamar.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Evaluar hidrolizados de *Dosidicus gigas* con propiedades bioactivas sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas de un embutido a base de calamar durante su vida útil.

4.2. Objetivos específicos

- ❖ Obtener hidrolizados a partir de músculo y colágeno de calamar gigante.
- ❖ Determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de hidrolizados obtenidos.
- ❖ Caracterizar parcialmente hidrolizados a partir de *Dosidicus gigas*.
- ❖ Desarrollar un embutido cárnico a base de calamar adicionado con hidrolizados y evaluar su efecto sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas durante su vida útil.

5. Metodología

5.1. Materia prima

La materia prima utilizada para la obtención de los hidrolizados fue manto de calamar gigante lavado y cortado en porciones de 150 a 200g (12cmx12cmx2.5cm), almacenado en condiciones de congelación (-20°C) durante 20 meses utilizando bolsas de polietileno de alta densidad con sello hermético.

La materia prima destinada al desarrollo del embutido fue manto de calamar gigante con menos de 15 días a partir de la captura, lavado y congelado en porciones de 150 a 200g (12cmx12cmx2.5cm) hasta su utilización.

5.2. Tratamiento de la materia prima

5.2.1. Tratamiento para hidrolizados

- a) **Separación manual de colágeno:** se llevó a cabo mientras el manto de calamar se mantiene debajo de 4°C en el centro térmico, con el objetivo de asegurar la firmeza del músculo y facilitar la separación de las capas de colágeno.
- b) **Colágeno:** las porciones de colágeno separadas del manto (12cmx12cm) se colocaron en agua a 90°C durante 10 minutos.
- c) **Músculo:** Trozos de 6cmx6cmx2.5cm se colocaron en agua a 90°C durante 15 minutos.

5.2.2. Secado

- a) **Condiciones de secado:** la temperatura se mantuvo a 50°C+/- 1°C.
- b) **Colágeno:** se verificó la pérdida de peso cada 15 minutos, hasta no observar modificaciones.

- c) **Músculo:** se separó en láminas de 6cmx6cmx2mm para facilitar el proceso de secado, se verificó la pérdida de peso cada 30 minutos, hasta no observar modificaciones.

5.2.3. Molienda

La materia prima posterior al proceso de secado, con una humedad residual de 10% (colágeno) y 15% (músculo), fue sometida a molienda hasta obtener un tamaño de partícula de malla 30.

Los polvos obtenidos se mantuvieron en recipientes sellados herméticamente hasta su utilización.

5.3. Preparación de los medios de cultivo

Se suspendieron 30g/L de fuente de nitrógeno (colágeno, músculo o la mezcla de ambos) en un buffer de Fosfato-Citrato-Bicarbonato (50mM-200mM-100mM, pH 7.5), con agitación y calentamiento (60°C). Posteriormente se esterilizó en autoclave a 121°C/1atm/15min. Se almacenaron los medios así preparados se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su uso.

Se consideraron 5 mezclas de colágeno y músculo como fuente de nitrógeno para la obtención de los medios de cultivo a utilizar:

- a) 100% Colágeno
- b) 75% Colágeno, 25% Músculo
- c) 50% Colágeno, 50% Músculo
- d) 25% Colágeno, 75% Músculo
- e) 100% Músculo

5.4. Preparación del inóculo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633

La cepa fue sembrada en agar nutritivo para su crecimiento durante 22 horas a 28°C. Posteriormente se transfirió una colonia característica (1mm de diámetro, blanca, opaca, plana, bordes irregulares) a 50mL de caldo nutritivo, el cual se mantuvo en

agitación constante (120 rpm) durante 18 horas a 20°C. La concentración final del inóculo fue 4×10^6 UFC/mL

5.5. Proceso de fermentación sumergida

Las fermentaciones se llevaron a cabo en vasos para centrífuga de 250mL de capacidad, con 100mL de medio de cultivo y 2mL de inóculo de *B. subtilis*, en condiciones asépticas.

El proceso se llevó a cabo en agitación constante (120rpm), con un tiempo máximo de fermentación de 8 horas.

Se consideraron 20 unidades experimentales para cada medio de cultivo utilizado, retirando 4 unidades de cada medio de cultivo a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas de agitación (Figura 1).

Para la separación del hidrolizado obtenido, se centrifugaron las unidades experimentales a 8500 g durante 30 minutos, a una temperatura de 4°C.

Colágeno Tiempo	0% (20)	25% (20)	50% (20)	75% (20)	100% (20)
0 (20)					
2 (20)					
4 (20)					
6 (20)					
8 (20)					

Figura 1. Distribución de unidades experimentales

5.6. Mantenimiento de las muestras

Muestras líquidas: Se preparó una solución de crio-protectores (44g de sacarosa, 44mL de glicerol, 12mL de agua) y se añadió a los hidrolizados obtenidos en una

proporción 1:10 (crio-protectores: hidrolizado). La mezcla de hidrolizado/crio-protectores se mantuvo en congelación (-20°C) hasta su análisis.

Muestras sólidas: Se añadió etanol de 96° a los hidrolizados obtenidos, en una proporción 1:1, se mantuvieron en refrigeración durante 48 horas y se centrifugó a 6300 g durante 10 minutos para separar los componentes del hidrolizado. Los componentes fueron secados a 30°C durante 72 horas y almacenados en recipientes herméticos hasta su utilización en la formulación del embutido.

5.7. Proteína soluble

La determinación de proteína soluble se realizó directamente sobre los hidrolizados obtenidos, empleando las metodologías de Biuret y Bradford, utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

5.8. Actividad antioxidante

Las muestras fueron diluidas en una proporción 9:91 (hidrolizado: agua) y se utilizaron 10 µL de esta dilución para llevar a cabo las mediciones.

La determinación de actividad antioxidante se llevó a cabo siguiendo los métodos ABTS•+ y DPPH • descritos por Agrawal, Joshi & Gupta (2016), con algunas modificaciones. Se utilizaron 10µL de la dilución de hidrolizados con 1mL de las disoluciones con los radicales y se agitaron en vortex durante 30 segundos. Las determinaciones se llevaron a cabo cada 10 minutos hasta 60 minutos a una longitud de onda $\lambda= 734\text{nm}$ para ABTS•+, y a una longitud de onda $\lambda=515\text{nm}$ para DPPH•. El porcentaje de inhibición de los radicales se comparó con una curva estándar de ácido L-ascórbico para cada radical.

5.9. Capacidad antimicrobiana: método Kirby-Bauer (difusión en disco)

Se utilizaron discos de celulosa estériles de 5mm de diámetro, distribuidos en una caja Petri con agar nutritivo (Figura 2).

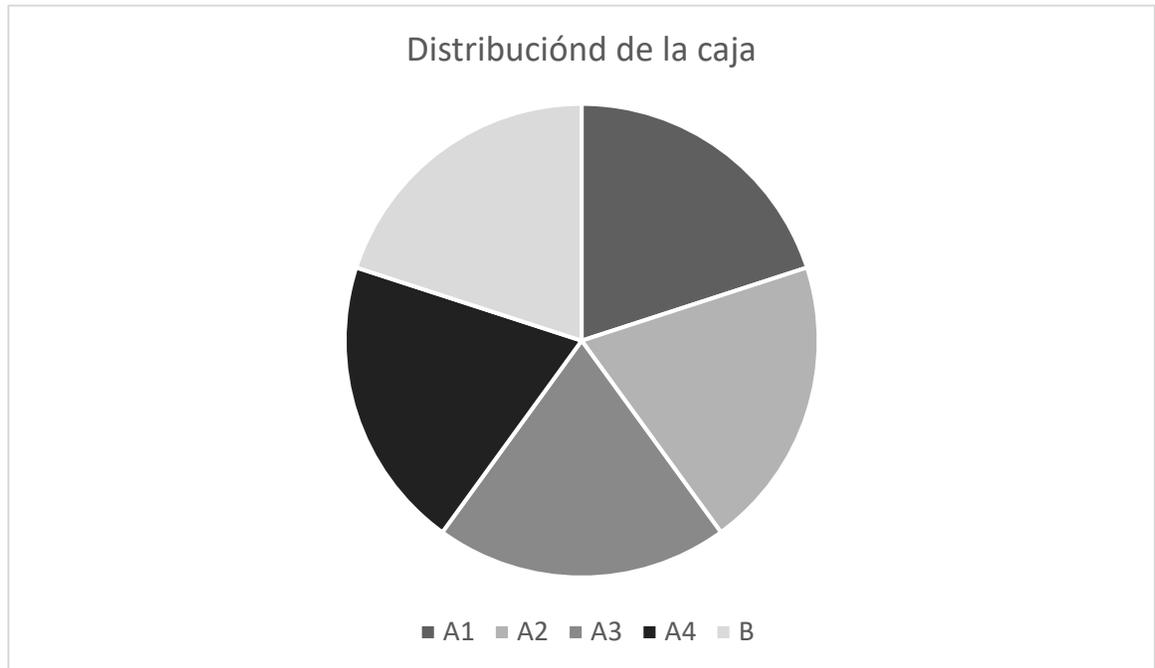


Figura 2. Distribución de muestras en la caja Petri

Donde A1 hasta A4 son discos con la misma unidad experimental y B es un disco con agua estéril. Se utilizó una disolución de amoxicilina y ácido clavulánico (3.5µg/0.5µg/mL) como testigo positivo en una caja petri de forma individual. A cada disco se le colocaron 10µL del líquido respectivo.

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas:

- a) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- b) *Escherichia coli* ATCC 25922
- c) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- d) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- e) *Salmonella typhimurium*
- f) *Enterobacter aerogenes* (*Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella mobilis*)
- g) *Proteus vulgaris*
- h) *Proteus mirabilis*

Para la preparación de las cajas se preparó una suspensión de cada cepa bacteriana con una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL, extendiéndose 100 μ L en las cajas de 90mm de diámetro con agar nutritivo.

Las cajas sembradas y con los discos de celulosa (con hidrolizados o antibiótico) fueron incubadas a 37°C durante 22 horas. Posteriormente se midió el diámetro de los halos de inhibición (mm).

5.10. Capacidad espumante

Se adicionaron 100 μ L de cada hidrolizado en tubos con 10mL de amortiguador de fosfatos (50mM, pH 7.0), y se utilizó un Tissue Tearor [Model 985370 Variable speed 5000-35000 rpm, Biospec Products Inc.] a 20,000rpm, durante 1min a 20°C para la generación de las espumas. La capacidad espumante se estableció como el incremento en volumen, respecto al volumen inicial en porcentaje (p.e. 100% indica que se generaron 10mL de espuma, a partir de los 10mL originales)

Las espumas obtenidas con cada hidrolizado se mantuvieron a 20°C durante 30 minutos, la estabilidad se determinó como el porcentaje en volumen de espuma que se mantuvo al finalizar (p.e. con un volumen de espuma inicial de 10mL, una estabilidad del 40%, indica que, al pasar 30 min, solamente permanecieron 4mL de espuma)

5.11. Capacidad emulsionante

El índice de actividad emulsionante (EAI) permite comparar la eficiencia de formación de emulsiones entre distintos tipos de proteínas, bajo las mismas condiciones de trabajo en laboratorio como punto de comparación, por lo que para esto se utilizó albúmina de huevo encontrándose un valor de 35 m²g⁻¹.

Se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Jemil *et al.* (2014) con modificaciones, 100 μ L de hidrolizado se homogenizaron con 5mL de agua y 5mL de aceite de canola utilizando un Tissue Tearor [Model 985370 Variable speed 5000-35000 rpm, Biospec Products Inc.] a 30,000rpm durante 1 min, a 20°C. Se tomaron 50 μ L del fondo de la emulsión y se diluyeron 100 veces con una disolución de SDS

al 0.1% (p/v). La absorbancia de las diluciones se midió a 500nm inmediatamente (A_0) y 10 minutos después de la formación de la emulsión (A_{10}) usando un espectrofotómetro [UV-Visible Spectrophotometer; Thermo Scientific GENESYS 10S Series], y se utilizó para determinar el índice de actividad emulsionante (IAE) y el índice de estabilidad emulsionante (IEE) con las siguientes fórmulas:

$$IAE [m^2 g^{-1}] = \frac{2 * 2.303 * A_0}{0.25 * P}$$

$$IEE [min] = \frac{A_0}{\Delta A} * t$$

Donde:

P= Concentración de proteína contenida en los 100 μ L de hidrolizado utilizados, expresada en gramos

$$\Delta A = A_0 - A_{10}$$

5.12. Efecto sobre geles

Se preparó una disolución de grenetina al 5%, la cual se adicionó a recipientes cilíndricos de 3.5cm de diámetro, con una proporción de 100 μ L de hidrolizado y 30mL de disolución de grenetina. Los recipientes se refrigeraron 20 horas y se sometieron a un análisis de perfil de textura (TAX-T2), evaluando la fuerza requerida para romper los geles. Se siguió la metodología descrita por Okita *et al.* (2020).

5.13. Bioactividad *in vitro* de hidrolizados seleccionados

5.13.1. Infrarrojo

El espectro infrarrojo de los hidrolizados liofilizados se obtuvo de acuerdo con Djellouli *et al.* (2019), utilizando 1mg de muestra a temperatura ambiente en un espectrómetro Jasco FT/IR 400, en un rango de 600-4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

5.13.2. ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

El ensayo ORAC se llevó a cabo usando el método reportado por Sae-leaw *et al.* (2016) con algunas modificaciones, utilizando 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro como radical peroxilo, y fluoresceína como agente fluorescente. La pérdida de fluorescencia se determinó cada 70 s durante 70 min con una longitud de onda de 485 nm para excitación y 535 nm para emisión utilizando un espectrofotómetro. Los resultados se calcularon utilizando una curva estándar de Trolox, expresados como μmol de Trolox equivalentes por gramo de muestra ($\mu\text{mol TE/g}$)

5.13.3. Inhibición de enzimas

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(Abs_b - Abs_m)}{Abs_b} \times 100$$

Donde Abs_b es la absorbancia del control (blanco, sin muestra), y Abs_m es la absorbancia en presencia de la muestra.

Inhibición de α -glucosidasa

La capacidad de inhibición de α -glucosidasa se determine de acuerdo con un ensayo modificado del Manual de Enzimas Worthingtoh reportado por Picos-Salas *et al.* (2021), la actividad enzimática se determine midiendo la liberación de p -nitrofenol del sustrato p -nitrofenil- α -glucopiranosido por la acción de α -glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* (0.6 U/mL). Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplaca con 96 pozos. Adicionalmente, se utilizó acarbosa (50 μL , 1 mM) como testigo.

Inhibición de α -amilasa

El ensayo de inhibición de α -amilasa se determinó de acuerdo con la metodología modificada del Manual de Enzimas Worthington reportada por Picos-Salas *et al.* (2021), la reacción se realizó a 37 °C por 10 min con 50 μL

de α -amilasa pancreática (13 U/mL), 50 μ L de almidón (1%) y 50 μ L de muestra. Posteriormente, se añadió 1 mL de reactivo de ácido dinitrosalicílico, y la solución se calentó a 85 °C por 15 min, se transfirió la solución a un baño de hielo para enfriamiento a temperatura ambiente, y se añadió 1 mL de agua destilada. Finalmente, 250 μ L de cada muestra se colocaron en una placa de 96 pozos, y la absorbancia se midió a 540 nm utilizando un lector de microplaca. Como testigo se utilizó acarbosa (50 μ L, 1 mM).

Inhibición de lipasa

La capacidad de inhibición de lipasa se determinó usando el método espectroscópico reportado por Cam-Van *et al.* (2022). En este ensayo, p -nitrofenil palmitato se utilizó como sustrato, el cual fue hidrolizado por lipasa a p -nitrofenol. La liberación de p -nitrofenol se monitoreó a 410 nm durante 10 min a 37 °C usando un lector de microplacas. Se utilizó Orlistat (1 mg/mL) como inhibidor de referencia.

Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina 1 (ECA1)

La capacidad de inhibición de la ECA1 se determinó utilizando el método reportado por Korczek *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Brevemente, 50 μ L de muestra se disolvieron en 200 μ L de buffer de borato 0.1 M (pH 8.3) que contenía también NaCl 0.3 M y se mezcló con 50 μ L de la solución de ECA1 (2 mU/mL). La mezcla fue preincubada a 37°C por 10 min, después de lo cual se adicionaron 150 μ L del sustrato (hipuril-histidil-leucina). La liberación de ácido hipúrico se determinó por absorbancia en un espectrofotómetro de arreglo de fotodiodos a 288 nm. El blanco de reactivos fue preparado sin la adición de la enzima, y el control se preparó sin la adición de hidrolizados. Captopril (1 mg/mL en la mezcla final) se utilizó como inhibidor de referencia.

5.14. Desarrollo del embutido

Se utilizó manto de calamar gigante congelado durante 14 días post-captura, separando las capas interna y externa de colágeno del músculo antes de su uso. El

porcentaje utilizado de cada ingrediente se determinó por el grupo de trabajo mediante estudios previos. Los ingredientes se añadieron a la cutter en el siguiente orden: músculo de calamar gigante, cloruro de sodio, mezcla de fosfatos, agua/hielo, aceite, especias, maltodextrina, almidón y mezcla de fibra. La formulación utilizada fue la siguiente (porcentaje w/w): músculo de calamar gigante 70.5%, agua/hielo (3:7) 10%, aceite de canola 6%, mezcla de fibra cítricos (CITRI-FITTM 100)/inulina (5:5) 4%, maltodextrina (100 DE) 4%, almidón de maíz 2%, mezcla de fosfatos (monobásico de sodio 23 g: dibásico de sodio 47 g) 1.4%, especias (clavo, comino, canela, nuez moscada, albahaca, eneldo, cilantro, ajo, pimienta negra, jengibre, cúrcuma, chile chipotle en adobo -equivalente a 1% w/w en la formulación final) 1.4%, cloruro de sodio 0.7%.

5.15. Evaluación del embutido durante la vida útil

5.15.1. Análisis inicial

Se determinaron mediante métodos AOAC (2000): humedad, proteína, grasa, fibra y ceniza de los embutidos de calamar gigante, carbohidratos por diferencia. Además de la presencia de *S. aureus*, *Salmonella* spp y Coliformes (AOAC, 2000).

5.15.2. Almacenamiento

Determinación de pH

De acuerdo con lo descrito por Verma et al. (2018), se homogenizaron 10 g de muestra con 90 mL de agua destilada durante un minuto, con licuadora Osterizer, y la disolución resultante fue filtrada con Whatman® quantitative filter paper, ashless Grade 42. Se determinó el pH empleando un potenciómetro (Conductronic PH 120, México).

Determinación de Bases volátiles totales (TVB)

El contenido de TVB se determinó usando el método de microdifusión de Conway, de acuerdo con Riebroy et al. (2007). Para la titulación se utilizó el

indicador Conway (0.125 g de rojo de metilo en 10 mL de NaOH 0.05 N, 0.080 g de azul de metileno en 90 mL de agua destilada) y una solución 0.01N de HCl hasta que el color verde cambió a rosa.

Determinación de la capacidad de retención de agua (WHC)

Se determinó de acuerdo con el método propuesto por Zhou et al. (2018) con modificaciones. Vasos de policarbonato con capacidad de 250 mL pesados previamente se llenaron con 2 círculos de papel filtro y 5 g de muestra sobre ellos, se centrifugaron a 3000 x g por 60 min a 4 °C, la capacidad de retención de agua se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$WHC (\%) = \frac{\textit{weight after centrifugation}}{\textit{initial weight}} \times 100$$

Color

El color de los embutidos se determinó usando un Colorímetro (Minolta Camera Co. LTD, CR-200, Osaka, Japan) con el sistema de color CIE L*a*b*. El instrumento se estandarizó utilizando una placa de calibración Minolta blanco y negro. Los valores se mostraron como L* (luminosidad), a* (rojo) y b* (amarillo).

Análisis microbiológico

Se empleó el método de cuenta en placa, 10 g de muestra se homogeneizaron con 90 mL de solución de peptona al 0.1%. Se llevaron a cabo diluciones decimales a partir de esta dilución, colocándose en placa adicionado plate count agar. Para la determinación de cuenta total viable (CTV), las placas inoculadas se incubaron a 35 °C por 48 h y por 7 días a 4 °C para determinar la cuenta de bacterias psicrófilas (CBP). Para determinar coliformes totales, a las placas inoculadas se les adicionó agar bilis rojo violeta RVBA, incubándose por a 36 °C por 24 h. Las cuentas se expresaron como logaritmos de unidades formadoras de colonia por gramo (Log CFU/g), llevándose a cabo por duplicado (Hajfathalian et al., 2019; ISO 21528-2; Sallam, 2007).

6. Resultados y discusión

6.1. Materia prima

El manto de calamar gigante (congelado durante 20 meses) fue separado en músculo (M) y colágeno (C) de manera manual, para evaluar el efecto que podría tener la presencia mayoritaria de M o C en la producción de hidrolizados y las propiedades *in vitro* que pudieran presentar.

Los tratamientos de la materia prima tuvieron por objetivo facilitar su uso en el desarrollo de los medios de cultivo e incrementar el tiempo de almacenamiento para la producción de varios lotes de medios de cultivo (Figura 3).

Para establecer un control sobre el contacto entre los sistemas enzimáticos del microorganismo y la fuente de nitrógeno, se empleó el tamaño de partícula (malla 30).



Figura 3. Tratamiento del músculo y colágeno de calamar gigante para obtener harinas.

6.2. Preparación de los medios de cultivo

Para determinar el proceso de preparación de los medios de cultivo, se consideró el tiempo necesario para la formación de un biofilm sobre las partículas de la fuente de nitrógeno. Al agitar los medios de cultivo después de los tiempos y temperaturas de incubación probados, la presencia del biofilm se demostró por la agregación de las partículas de la fuente de nitrógeno (Figura 4).

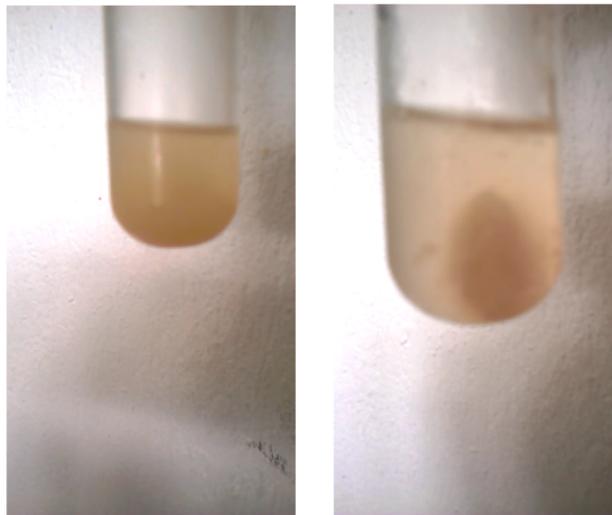


Figura 4. Prueba de presencia de biofilm en medios de cultivo inoculados

Los procesos de fermentación reportados (Jemil *et al.*, 2014;) indican tiempos de hasta 72 horas con temperaturas de los 20-35°C, sin embargo se utilizaron sistemas con equipos para oxigenación constante.

La fermentación se llevó a cabo en sistemas cerrados. Se utilizaron frascos de policarbonato de 250mL de capacidad con 100mL de medio de cultivo para estandarizar las condiciones de oxígeno disponible.

Junto con los tiempos y temperaturas probados para incrementar la velocidad de crecimiento de *B. subtilis*, se probaron tratamientos térmicos intermedios sobre los medios de cultivo (previos a la inoculación, adicionales al proceso de esterilización). Tratamiento térmico intermedio: la fuente de nitrógeno se suspendió en el

amortiguador de fosfato-citrato-bicarbonato, y se sometió a calentamiento (70°C, 30min) en agitación constante (120rpm), se permitió que recuperara la temperatura ambiente (20°C) y se sometió a esterilización. Obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Efecto de tiempos de incubación, temperaturas de incubación y medios de cultivo con tratamientos térmicos intermedios sobre la aparición de biofilm en el medio de cultivo.

Tiempo	Temperatura	Tratamiento térmico intermedio	Aparición de biofilm
72 horas	35°C		Positivo
72 horas	20°C	X	Positivo
48 horas	35°C		Positivo
48 horas	20°C	X	Positivo
24 horas	35°C		Positivo
24 horas	20°C	X	Positivo
12 horas	35°C		Negativo
12 horas	20°C	X	Positivo
8 horas	35°C		Negativo
8 horas	20°C	X	Positivo
6 horas	35°C		Negativo
6 horas	20°C	X	Negativo

Debido a los resultados obtenidos, se decidió llevar el tratamiento térmico intermedio, que incrementó la velocidad de crecimiento de *B. subtilis*, posiblemente debido a la liberación de sitios en los que actúan los sistemas enzimáticos de *B. subtilis*, facilitando la adquisición de nutrientes para el crecimiento. Adicionalmente, se reduce la energía y tiempo utilizados para el ajuste de temperatura requerido sin el proceso térmico intermedio.

6.3. Proceso de fermentación sumergida

Los medios de cultivo inoculados con la suspensión de *B. subtilis* se sometieron a agitación constante (120rpm) durante los tiempos establecidos (2, 4, 6 y 8 horas, con una unidad experimental adicional inoculada, pero sin agitación, equivalente a 0 horas) (Figura 5). Una vez concluidos los procesos de fermentación, se centrifugaron los frascos a 8500g durante 30 minutos a 4°C, para separar las partículas de fuente de nitrógeno no utilizadas, así como células y esporas de *B. subtilis*.



Figura 5. Proceso de fermentación sumergida

Para la evaluación de propiedades *in vitro*, se almacenaron los hidrolizados en forma líquida (Figura 6), con crio-protectores y en condiciones de congelación. Para considerar los rendimientos de los procesos fermentativos, se llevó una precipitación con ayuda de etanol (96°) en una relación 1:1 con el hidrolizado líquido. Las fracciones precipitadas se separaron por decantación y se secaron a 30°C durante 72 horas (Figura 7).



Figura 6. Muestras líquidas de los hidrolizados obtenidos



Figura 7. Muestras sólidas de los hidrolizados obtenidos

El rendimiento global de cada fermentación fue de 3.2 ± 0.3 g por cada 100 mL, independientemente del tiempo de agitación (2,4,6 y 8 horas) o la composición del medio de cultivo (Figura 8), estos resultados fueron mayores a los reportados por Jemil et al. (2014) para *Sardinella aurita*, *Salaria basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* y *Dasyatis pastinaca*, con rendimientos de 9 g por L en 24 horas, esto puede ser debido a la presencia de un contenido apropiado de una fuente de carbono (Orhan et al., 2005; Elumalai et al., 2020), en el presente estudio el citrato podría estimular la expresión de enzimas hidrolíticas y generación de compuestos bioactivos. Por otro lado, en el sustrato empleado para la fermentación, a partir del tiempo cero obtuvo un rendimiento de 120 ± 7 mg por cada 100 mL, probablemente debido a la hidrólisis sobre la fuente de nitrógeno, generada con el tratamiento térmico intermedio (Korczyk et al., 2019; Siewe et al., 2020) y la producción de metabolitos de *B. subtilis* durante el proceso de generación del inóculo en caldo nutritivo (Arima, 1968; Hassan and Ibrahim, 2017; Uddin et al., 2017).



Figura 8. Cristales obtenidos por secado de los hidrolizados obtenidos durante la fermentación

Al llevar a cabo la precipitación del hidrolizado, se encontraron 2 fracciones principales derivadas de la hidrólisis de la fuente de nitrógeno y del metabolismo de *B. subtilis*, la fracción inferior presentó coloración similar a la fuente de nitrógeno y al deshidratarse se presenta como un polvo blanco-amarillo, por lo que se presume es la fracción derivada de la hidrólisis de proteínas; mientras que la fracción superior presenta un color transparente y al deshidratarse forma cristales, por lo que se presume contiene los metabolitos generados por *B. subtilis* durante el proceso de fermentación.

6.4. Proteína soluble

Las determinaciones para proteína soluble se hicieron de acuerdo con las metodologías de Biuret y Bradford. Entre ellas no se encontraron diferencias significativas para la cuantificación de proteína soluble en cada hidrolizado probado.

Con los resultados obtenidos se logró obtener una superficie de respuesta (Figura 9), en donde se encontró que existe una relación directa entre la composición del medio

(en relación con la fracción de colágeno utilizada como fuente de nitrógeno) y la concentración de proteína soluble.

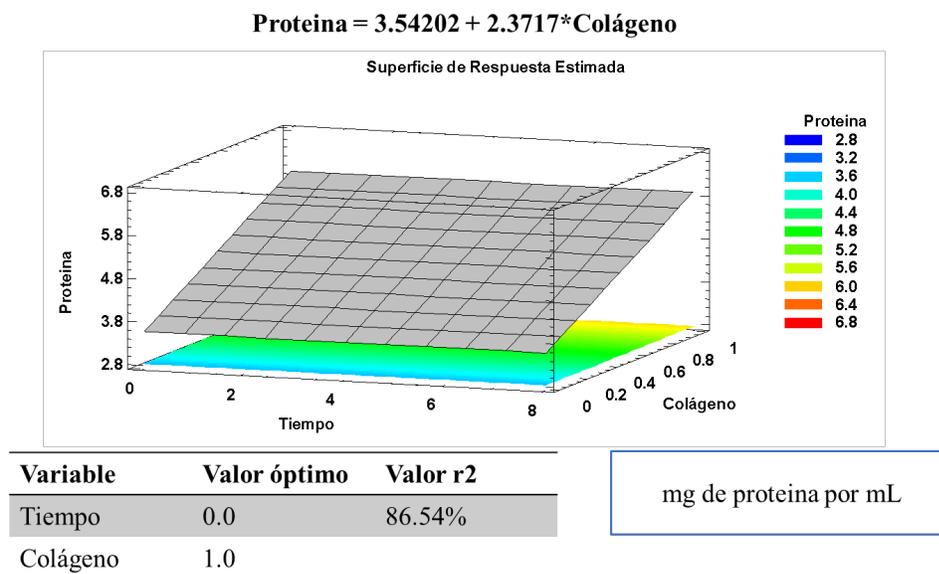


Figura 9. Superficie de respuesta obtenida para proteína soluble de los hidrolizados

Esto puede deberse principalmente a las limitaciones en ambas metodologías, es decir, su capacidad de cuantificar fragmentos proteicos de menor peso molecular, ya que esto pudo derivar en la no cuantificación de los productos de hidrólisis de la fuente de nitrógeno durante la fermentación.

6.5. Actividad antioxidante

Los resultados obtenidos entre las distintas metodologías tienen una diferencia en magnitud, con la metodología ABTS•+ se encontraron concentraciones equivalentes a miligramos de ácido L-ascórbico, mientras que con la metodología DPPH• se obtuvieron concentraciones equivalentes a microgramos de ácido L-ascórbico. Estos resultados sugieren que los componentes de los hidrolizados responsables de atrapar radicales libres se encuentran con mayor disponibilidad en medios acuosos (ABTS•+), mientras que en medios orgánicos (DPPH•) tienen una menor

disponibilidad para atrapar radicales libres, esto debido a los cambios conformacionales que suceden al interactuar los componentes del hidrolizado con el metanol (DPPH), exponiendo grupos hidrófobos de los péptidos, presumiblemente responsables de la actividad antioxidante de los hidrolizados (Mhina, 2020).

Con los resultados obtenidos por los métodos ABTS^{•+} (Figura 10) y DPPH[•] (Figura 11) se logró obtener dos superficies de respuesta, en las cuales se observa existe una tendencia respecto al tiempo de fermentación, disminuyendo la actividad antioxidante a las 2 horas respecto al tiempo 0, posiblemente debido a la utilización de fracciones proteicas existentes como fuente de nitrógeno por *B. subtilis* durante esta etapa de crecimiento (Yuliani et al., 2018; Kai, 2020). A partir de las 4 horas, y hasta el final de la fermentación, se observa un aumento de la actividad antioxidante posiblemente relacionado con el incremento en la producción de enzimas por la etapa de crecimiento correspondiente de *B. subtilis* (Ling Ho, 2015) y, como consecuencia, mayor concentración de fragmentos proteicos de bajo peso molecular capaces de atrapar radicales libres (Mhina, 2020), ya que, de acuerdo con Saallah et al. (2020) la capacidad de captura del radical DPPH incrementa al disminuir el peso molecular en los hidrolizados de proteína, esto podría deberse a la exposición de residuos de aminoácidos de cadena lateral, facilitando la interacción entre péptidos y radicales libres (Saallah, et al., 2020). Adicionalmente, para los resultados obtenidos en medio acuoso (ABTS^{•+}) se encontró el valor óptimo en 4.6% de colágeno, respecto a la fuente de nitrógeno (30g/L), con 8 horas de fermentación; mientras que para los resultados en medio orgánico (DPPH[•]) el valor óptimo se encontró con un 100% de colágeno, respecto a la fuente de nitrógeno (30g/L), con 8 horas de fermentación.

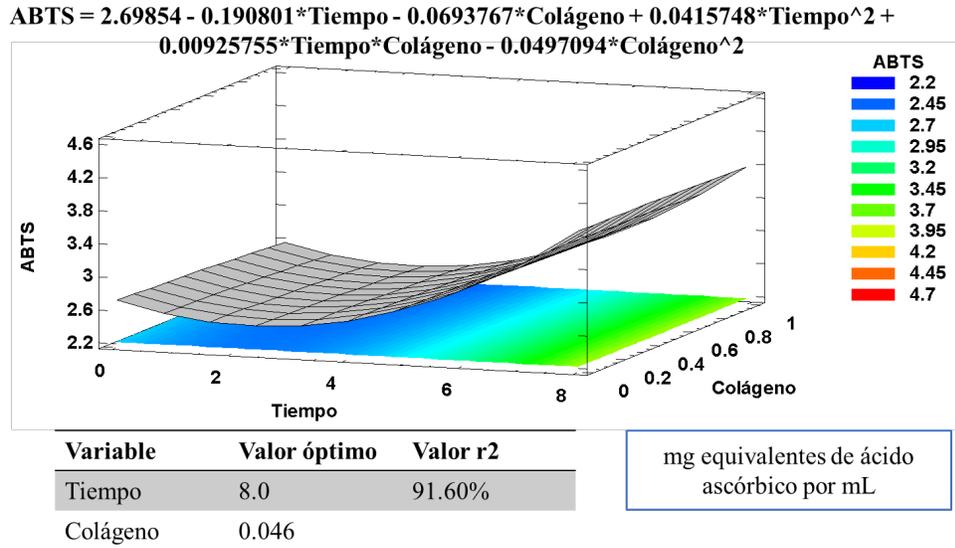


Figura 10. Superficie de respuesta obtenida para capacidad antioxidante ABTS^{•+} de los hidrolizados

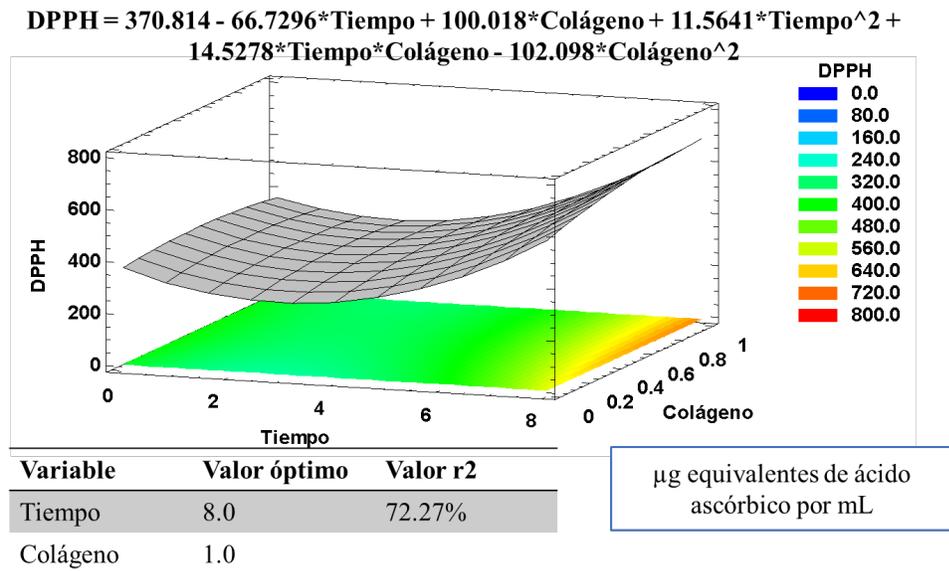


Figura 11. Superficie de respuesta obtenida para capacidad antioxidante DPPH[•] de los hidrolizados

La importancia de estos resultados radica en las futuras aplicaciones de estos hidrolizados. De acuerdo con las características del alimento o matriz en las que se desea integrar este tipo de componentes, es necesario considerar la capacidad que

tienen de demostrar su actividad antioxidante para las condiciones requeridas. En este trabajo utilizamos un embutido prototipo a base de calamar gigante, en el cual se utilizó aceite de canola para lograr la emulsión requerida. Por ello, elegimos utilizar los hidrolizados considerados con mayor actividad, logrando una mayor cobertura para detener los procesos oxidativos en la fase lipídica y la fase acuosa.

6.6. Capacidad antimicrobiana: método Kirby-Bauer (difusión en disco)

La capacidad antimicrobiana fue evaluada utilizando los halos de inhibición formados alrededor de los discos de celulosa. A diferencia de la capacidad antioxidante, el comportamiento no pudo ser ajustado a una superficie de respuesta utilizando modelos cuadráticos para tiempo de fermentación o para composición del medio de cultivo.

Esto puede ser debido a que durante el proceso de hidrólisis se generan péptidos con propiedades antimicrobianas con efectos inhibitorios contra microorganismos causantes de la invasión y deterioro de alimentos, incluyendo un amplio rango de patógenos in vivo, como bacterias, hongos y virus, al igual que parásitos (Abdelmoteleb et al., 2017; Hussain et al., 2020). La acción y efectividad de estos péptidos biológicamente activos varía dependiendo de las características estructurales, como son el tamaño del péptido, la composición de aminoácidos, la carga, hidrofobicidad y estructura secundaria. Debido a ello, éstos muestran una variada selectividad y sensibilidad sobre los microorganismos diana (Kannan et al., 2012; Patrzykat et al., 2005).

La mayoría de los péptidos antimicrobianos poseen características en común independientemente de la fuente de origen. Usualmente están compuestos por menos de 50 aminoácidos de los cuales aproximadamente el 50% son aminoácidos hidrofóbicos, y se conforman espacialmente en una estructura 3D anfipática (Ryldo et al., 2006). Teniendo un exceso de aminoácidos básicos (lisina y arginina), los péptidos antimicrobianos poseen una carga neta positiva. Tener naturaleza catiónica y anfipática son dos características estructurales importantes para la actividad antimicrobiana, el carácter hidrofóbico permite a los péptidos entrar a la membrana,

mientras que la carga positiva inicia la interacción con la superficie de la bacteria cargada negativamente (Wieprecht et al., 1997; Gómez-Guillén et al., 2010), por lo que la actividad antimicrobiana de los hidrolizados se relaciona en primera instancia con las fracciones proteicas y péptidos resultado de la acción de enzimas generadas por *B. subtilis*, durante el proceso, las cuales tienden a incrementar su actividad al disminuir el peso molecular (Gómez-Guillén et al., 2010). Así como relacionado a los metabolitos secundarios producidos por *B. subtilis*, que de acuerdo con Kaspar et al. (2019) y Wang et al. (2014), tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, entre ellos se encuentran péptidos sintetizados como el grupo de las irutrininas (lipopéptidos cíclicos), fengicinas (decapéptidos cíclicos, ocho aminoácidos forman la estructura cíclica), surfactinas (lipopéptidos cíclicos) y variantes adicionales (Cauller et al., 2019; Olishchevska et al., 2019; Wang et al., 2014).

Por ello se decidió determinar si existían diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$, por el método de Tukey) entre los 25 tratamientos establecidos (entre 5 tiempos de fermentación y 5 composiciones de medio de cultivo distintas). Posterior a la determinación de las diferencias significativas y la pertenencia a grupos (Tablas 2 y 3, un grupo de la misma columna comparte una codificación de letra), se asignó un valor de 2 a los grupos que tienen el mayor promedio para cada microorganismo, y un valor de 1 para el segundo grupo con un mayor valor promedio. Se eligieron los tratamientos que obtuvieron una mayor ponderación asignada, así como considerando cubrir los tratamientos que se encuentren en los grupos 1 o 2 para todos los microorganismos probados (Tabla 4).

Tabla 2. Capacidad antimicrobiana (halos de inhibición) de los hidrolizados obtenidos contra cepas ATCC

Tratamiento	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (Diámetro de inhibición mm)			<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (Diámetro de inhibición mm)			<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 (Diámetro de inhibición mm)			<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 (Diámetro de inhibición mm)		
	Promedio	Desviación estándar	Letras	Promedio	Desviación estándar	Letras	Promedio	Desviación estándar	Letras	Promedio	Desviación estándar	Letras
0-C0	10.3±	0.3	klm	9.0±	0.0	ghi	10.0±	0.0	e	11.3±	0.1	j
0-C100	8.0±	0.2	bcdef	7.9±	0.1	def	8.9±	0.1	cd	9.3±	0.1	cd
0-C25	7.1±	0.3	ab	9.6±	0.2	ij	8.1±	0.1	bc	10.8±	0.1	hij
0-C50	10.0±	0.3	ijklm	8.4±	0.1	efg	8.6±	0.1	bcd	9.4±	0.1	cde
0-C75	8.9±	0.2	defgh	8.9±	0.1	gh	8.6±	0.1	bcd	12.1±	0.1	k
2-C0	8.0±	0.2	bcde	7.4±	0.1	bc	10.1±	0.1	e	9.8±	0.1	defg
2-C100	9.2±	0.2	ghij	8.4±	0.1	efg	6.0±	0.0	a	11.1±	0.1	j
2-C25	7.9±	0.1	bcd	9.0±	0.0	ghi	10.0±	0.0	e	11.0±	0.2	ij
2-C50	8.1±	0.2	cdef	10.0±	0.0	jk	9.9±	0.1	e	9.0±	0.0	c
2-C75	9.7±	0.2	hijk	9.0±	0.0	ghi	8.0±	0.0	b	9.9±	0.1	defg
4-C0	9.0±	0.1	efghi	10.1±	0.1	jk	8.9±	0.1	cd	10.4±	0.2	ghi
4-C100	10.1±	0.1	ijklm	13.1±	0.1	n	11.1±	0.4	fg	10.1±	0.1	fgh
4-C25	12.1±	0.2	n	7.8±	0.1	bcd	11.0±	0.2	fg	10.0±	0.0	efg
4-C50	7.2±	0.1	abc	6.0±	0.0	a	11.1±	0.1	fg	10.0±	0.0	efg
4-C75	10.1±	0.1	ijklm	9.0±	0.2	ghi	10.4±	0.2	ef	9.6±	0.1	cdef
6-C0	9.0±	0.1	fghi	7.9±	0.1	def	9.0±	0.0	d	8.1±	0.1	b
6-C100	7.1±	0.1	abc	8.5±	0.0	fgh	10.1±	0.1	e	12.3±	0.1	k
6-C25	6.4±	0.2	a	7.1±	0.1	b	8.6±	0.1	bcd	9.4±	0.1	cde
6-C50	10.8±	0.3	lm	9.1±	0.1	hi	8.1±	0.1	bc	10.0±	0.0	efg
6-C75	7.7±	0.2	bc	9.9±	0.1	j	10.0±	0.0	e	10.0±	0.0	efg
8-C0	9.9±	0.1	hijkl	11.3±	0.1	lm	10.6±	0.1	ef	9.9±	0.1	defg
8-C100	8.1±	0.1	cdefg	10.0±	0.0	jk	9.0±	0.2	d	7.1±	0.1	a
8-C25	10.1±	0.2	ijklm	11.4±	0.1	m	11.1±	0.1	fg	9.0±	0.0	c
8-C50	6.2±	0.1	a	10.9±	0.1	lm	11.6±	0.2	g	11.4±	0.1	j
8-C75	11.0±	0.2	m	10.6±	0.1	kl	10.1±	0.1	e	8.0±	0.0	b

Promedios ± Desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas.

Tabla 3. Capacidad antimicrobiana (halos de inhibición) de los hidrolizados obtenidos contra cepas de microorganismos provenientes del Departamento de Análisis Microbiológicos de la Facultad de Química (UAEMex)

Tratamiento	<i>Salmonella typhimurium</i> (Diámetro de inhibición mm)			<i>Proteus mirabilis</i> (Diámetro de inhibición mm)			<i>Proteus vulgaris</i> (Diámetro de inhibición mm)			<i>Enterobacter aerogenes</i> (Diámetro de inhibición mm)		
	Promedio	Desviación estándar	Letra	Promedio	Desviación estándar	Letra	Promedio	Desviación estándar	Letra	Promedio	Desviación estándar	Letra
0-C0	6.0±	0.1	a	9.1±	0.1	bc	10.0±	0.1	efgh	9.9±	0.2	j
0-C100	6.0±	0.1	a	10.0±	0.1	d	9.4±	0.2	cde	8.6±	0.1	defgh
0-C25	6.0±	0.1	a	8.4±	0.1	a	7.1±	0.2	a	8.0±	0.1	bcd
0-C50	6.0±	0.1	a	8.5±	0.1	ab	8.4±	0.1	b	8.3±	0.1	cdef
0-C75	9.0±	0.1	d	9.3±	0.1	c	9.5±	0.1	cdef	8.9±	0.2	efghi
2-C0	6.0±	0.1	a	10.0±	0.1	d	7.0±	0.1	a	8.3±	0.1	cdef
2-C100	6.0±	0.1	a	10.9±	0.2	efg	9.6±	0.2	defg	9.3±	0.1	ghij
2-C25	6.0±	0.1	a	11.5±	0.1	ghi	10.3±	0.1	ghi	8.1±	0.2	bcde
2-C50	6.0±	0.1	a	9.1±	0.1	bc	10.9±	0.2	i	7.4±	0.3	b
2-C75	6.0±	0.1	a	11.3±	0.1	fghi	10.4±	0.2	hi	9.4±	0.1	hij
4-C0	9.9±	0.1	f	9.0±	0.1	abc	8.9±	0.1	bc	9.3±	0.1	ghij
4-C100	6.0±	0.1	a	9.1±	0.1	bc	10.5±	0.1	hi	9.9±	0.2	j
4-C25	9.5±	0.2	e	11.3±	0.1	fghi	10.5±	0.1	hi	9.6±	0.1	ij
4-C50	9.1±	0.1	d	10.6±	0.2	def	10.1±	0.2	fgh	8.5±	0.1	defg
4-C75	6.0±	0.1	a	10.6±	0.2	def	10.9±	0.2	i	9.0±	0.1	fghi
6-C0	7.1±	0.1	b	11.8±	0.1	i	11.9±	0.2	j	7.4±	0.3	b
6-C100	6.0±	0.1	a	10.0±	0.1	d	8.9±	0.1	bc	8.4±	0.1	cdef
6-C25	6.0±	0.1	a	11.4±	0.2	ghi	9.1±	0.2	cd	8.5±	0.1	defg
6-C50	9.0±	0.1	d	10.3±	0.1	de	9.6±	0.2	defg	8.9±	0.2	efghi
6-C75	6.0±	0.1	a	9.0±	0.1	abc	10.0±	0.1	efgh	8.1±	0.2	bcde
8-C0	6.0±	0.1	a	10.6±	0.2	def	9.1±	0.2	cd	8.0±	0.1	bcd
8-C100	9.1±	0.2	d	11.6±	0.1	hi	8.9±	0.1	bc	8.6±	0.1	defgh
8-C25	7.0±	0.1	b	11.9±	0.2	i	9.3±	0.1	cd	7.6±	0.1	bc
8-C50	8.0±	0.1	c	10.9±	0.2	efg	12.5±	0.1	j	7.9±	0.1	bcd
8-C75	6.9±	0.1	b	11.0±	0.1	fgh	10.0±	0.1	efgh	6.0±	0.1	a

Promedios ± Desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas.

Tabla 4. Ponderaciones asignadas para actividad antimicrobiana

T/C	S. aureus ATCC 25923	Salmonella typhimurium	Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	Proteus mirabilis	E.coli ATCC 25922	Proteus vulgaris	Pseudomona aeruginosa ATCC 27853	E. aerogenes	Total
0-C100									0
0-C75			2					1	3
0-C50	1								1
0-C25			1						1
0-C0	1		1					2	4
2-C100			1					2	3
2-C75				2		1		2	5
2-C50						1			1
2-C25			1			1			2
2-C0									0
4-C100	1				2	1	2	2	8
4-C75	1					1	1	1	4
4-C50							2		2
4-C25	2	1		2		1	2	2	10
4-C0		2						2	4
6-C100			2						2
6-C75									0
6-C50	1							1	2
6-C25				2					2
6-C0				2		2			4
8-C100				2					2
8-C75	1			1					2
8-C50			1		1	2	2		6
8-C25	1			2	1		2		6
8-C0					1		1		2

6.7. Capacidad espumante

Durante el proceso de fermentación se observa un incremento inicial en el volumen de espuma generado (Figura 12-A) a partir del tiempo 0, y después una disminución, posiblemente atribuida al acortamiento en la longitud de las fracciones proteicas presentes, derivado de la actividad de las enzimas producidas por *B. subtilis*. Jia et al. (2020) reportó un comportamiento similar en hidrolizados de ovoalbúmina en 9 horas de fermentación con lactobacilos, la capacidad de formación de espuma en los hidrolizados obtenidos durante el proceso de fermentación se encuentra relacionado estrechamente con la presencia de fracciones proteicas de alto peso molecular, mientras que Zamorano-Apodaca et al. (2020) menciona una reducción en la capacidad espumante al disminuir el peso molecular en hidrolizados obtenidos de una mezcla de subproductos de pescado utilizando la enzima alcalasa. De acuerdo con Saallah et al. (2020), al reducir el tamaño de las cadenas peptídicas disminuye la capacidad de estabilizar las burbujas de aire, necesaria para la generación de espuma, además, los péptidos más pequeños absorben agua de forma más rápida, lo cual disminuye la tensión superficial. De igual forma, la presencia de metabolitos de *Bacillus subtilis*, producto de la fermentación, puede impactar la capacidad de formación de espumas (Coutte et al., 2017).

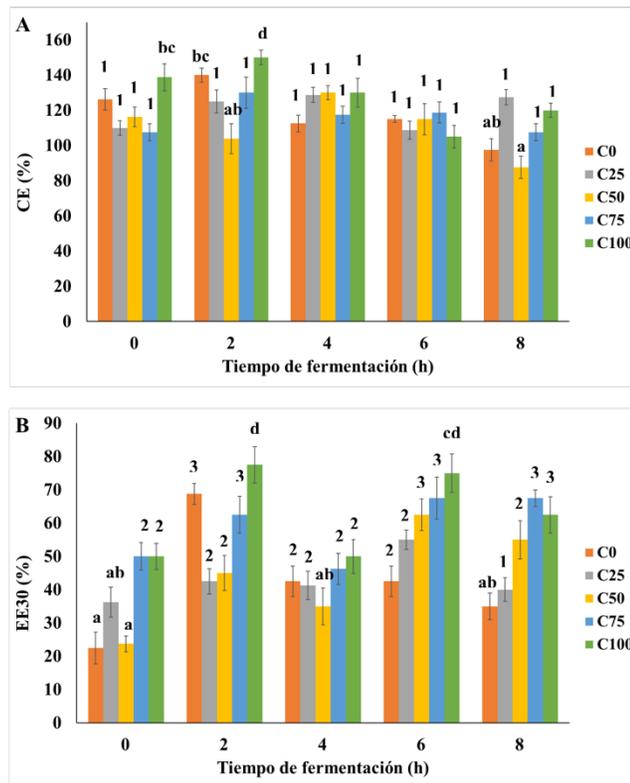


Figura 12. A) Capacidad espumante (CE) y B) Estabilidad de la espuma 30 min (EE30) de hidrolizados obtenidos vía fermentación con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a 0, 2, 4, 6 y 8 horas para medios de cultivo C0, C25, C50, C75 y C100. Los resultados se presentan como Promedio \pm Error estándar. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$). 1=abc; 2=abcd; 3=bcd

La estabilidad de la espuma generada por los hidrolizados tiene un comportamiento similar en los medios de cultivo independientemente de la composición (C0, C25, C50, C75 y C100), como se muestra en la Figura 12-B, presentando un porcentaje de estabilidad mayor en los tiempos 2 y 6 horas, de acuerdo con Ding et al. (2020) el incremento en la estabilidad espumante se puede deber al incremento de grupos hidrofóbicos expuestos y la reducción de la tensión superficial de la solución, lo cual facilita la difusión de las proteínas hacia la interfaz gas-líquido, dando como resultado la formación de películas más fuertes. Por otra parte, Jia et al. (2020) relaciona la reducción en el tamaño de los péptidos por la acción de las proteasas

debilita la capacidad de adsorción de las proteínas, lo cual disminuye la habilidad de mantener las burbujas y colapsan con facilidad. Los resultados de nuestro estudio tienen una tendencia similar a los reportados por Klompong et al. (2007) para hidrolizados de *Selaroides leptolepis* preparados utilizando Alcalase y Flavourzyme, que sugiere que esto se puede relacionar con la presencia de fracciones proteicas de mayor tamaño, que pueden formar capas más flexibles alrededor de las burbujas de aire, necesarias para estabilizar la espuma generada.

6.8. Capacidad emulsionante

En la Figura 13-A se observa un incremento significativo ($p < 0.05$) en el índice de emulsificación dependiente del tiempo, coincidiendo con lo reportado por Zamorano-Apodaca et al. (2020) que observaron un incremento en el EAI al reducir el MWCO de hidrolizados de colágeno obtenidos de mezclas de subproductos de varias especies (different sharks, mullet, guitarfish, weakfish, snapper, ray, squid, seabass, and pompano dolphinfish).

Saallah et al. (2020) menciona que la reducción en el peso molecular de las fracciones proteicas presentes incrementa el valor del índice de capacidad emulsionante (EAI), puede ser el resultado de la alteración del hidrolizado debido a que la hidrólisis parcial facilita la difusión e interacción en la interfaz agua-aceite, originado por una reducción en el peso molecular y mayor solubilidad. Adicionalmente, la hidrólisis parcial permite el desdoblamiento de las proteínas presentes, exponiendo grupos hidrofóbicos y, por lo tanto, incrementando la interacción entre lípidos y proteínas (Karami et al., 2019). Por otro lado, Liu et al. (2014) y Klompong et al. (2007) observaron una disminución en el EAI al incrementar el grado de hidrólisis de las muestras, sin embargo, Hajfathalian et al. (2017) menciona que no hay una tendencia en los resultados reportados para capacidad y estabilidad emulsionante debido al grado de hidrólisis o enzima utilizados, por lo que recomiendan que para mantener o mejorar las propiedades de emulsificación de los hidrolizados se debe controlar el proceso de hidrolisis, ya que

una hidrólisis excesiva puede provocar una pérdida en las propiedades emulsificantes.

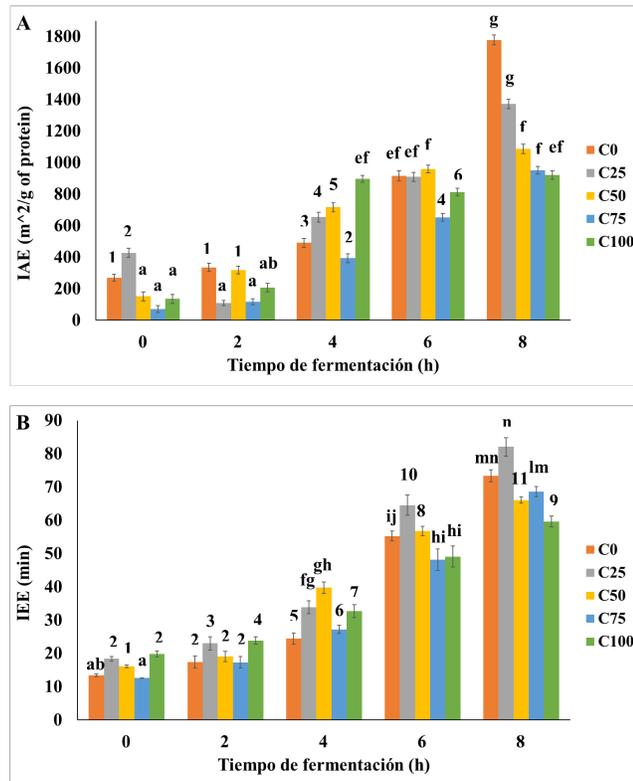


Figura 13. A) Índice de Actividad Emulsionante (IAE) y B) Índice de Estabilidad Emulsionante (IEE) de hidrolizados obtenidos vía fermentación con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a 0, 2, 4, 6 y 8 horas para medios de cultivo C0, C25, C50, C75 y C100. Los resultados se presentan como Promedio \pm Error estándar. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

A) 1=abc; 2=abcd; 3=abcde; 4=bcdef; 5=cdef; 6=def

B) 1=abc; 2=abcd; 3=bcde; 4=bcdef; 5=cdef; 6=def; 7=efg; 8=ijk; 9=jkl; 10=jklm; 11=klm

En la Figura 13-B se observa el incremento dependiente del tiempo de ESI, esta tendencia es contraria a la encontrada por Klompong et al. (2007) y Liu et al. (2014), quienes reportan una disminución del valor ESI al incrementar el grado de hidrólisis y Zamorano-Apodaca et al. (2020) al utilizar fracciones de hidrolizados con menor peso molecular. Esto podría deberse a la presencia de metabolitos propios de la fermentación con *Bacillus subtilis*, que presentan capacidad emulsionante, entre

ellos pudiéndose encontrar surfactin One lipopeptide which composes a linear fatty acid and cyclic peptide moiety, que ha demostrado dicha capacidad independientemente de los residuos utilizados para su obtención, como cashew apple (Felix et al., 2019), waste frying oil (Valenzuela-Ávila et al., 2019) and sugarcane molasses (Rocha et al., 2020); es posible sugerir la presencia de estos compuestos debido a los picos formados en los valores en 1510 cm^{-1} , 1392 cm^{-1} y 1198 cm^{-1} del FTIR (Figura F), que coinciden con lo reportado por Verma et al. (2020). Hoffmann et al. (2021) sugiere que surfactin presenta características estabilizantes debidas a interacciones electrostáticas, siendo por lo tanto un candidato prometedor como emulsionante y estabilizador en formulaciones alimenticias, incluso con un mejor desempeño que lecitinas.

6.9. Efecto sobre geles

El uso de los hidrolizados como fuente de péptidos bioactivos con función antioxidante o emulsionante se puede dirigir a geles de pescado (Lu et al., 2013). En el presente estudio se evaluó el efecto de los hidrolizados obtenidos sobre la dureza de geles de grenetina (Figura 14), encontrándose una reducción de la dureza de los geles hasta un 70.4% (C50, 8h). No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos de fermentación 0h y 8h para cada medio de cultivo, encontrándose diferencias entre el medio de cultivo C50 con 8h de fermentación con los medios C25 y C100 en tiempos de 0 y 8h, esta diferencia podría deberse a la composición de los medios de cultivo, pudiéndose alcanzar una relación de aminoácidos óptima para la generación de proteasas en el medio de cultivo C50.

Lu et al. (2013) y Singh and Benjakul (2018) mencionan a la textura como uno de los atributos de calidad en alimentos que afectan la aceptabilidad y el valor de mercado, particularmente en pescado y productos de pescado, lo que sugiere la necesidad de inactivar dichas proteasas antes de ser utilizadas en productos de esta naturaleza. Por otro lado, hidrolizados con proteasas activas pueden dirigirse a objetivos específicos, como Okita et al. (2020), quienes utilizaron alcalasa en geles de surimi con el objetivo de disminuir la dureza, adhesividad y cohesividad de geles

destinados a personas que sufren disfagia, así mismo, podría utilizarse como tenderizador de carne, Bekhit et al. (2017) observaron que proteasas de *Bacillus* sp tienen una capacidad autolimitante que representa una ventaja para controlar problemas como la sobretenderización y mushy texture en la carne, a diferencia de las proteasas vegetales que frecuentemente presentan este tipo de problemas.

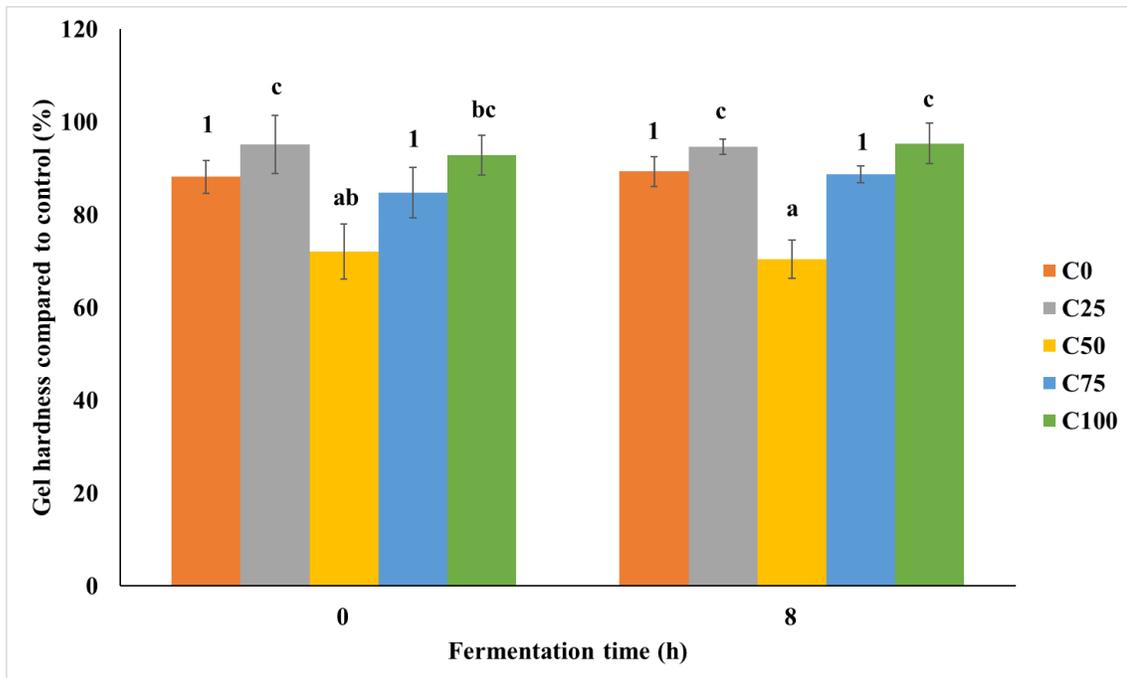


Figura 14. Dureza de gel comparada con el contro de gles de grenetina adicionados con hidrolizados obtenidos vía fermentación con *Bacillus subtilis* ATCC 6633 a 0, 2, 4, 6 y 8 horas para medios de cultivo C0, C25, C50, C75 y C100. Los resultados se presentan como Promedio \pm Error estándar. Diferentes letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$). 1=abc

6.10. Infrarrojo

La espectroscopía de IR se ha utilizado para obtener información acerca de la composición química y estructura conformacional de diversos compuestos (Gómez-Guillén et al., 2010), el espectro infrarrojo de absorción (4000 a 650 cm^{-1}) para las

muestras de hidrolizados obtenidos en este estudio, después de 8 horas de fermentación C0, C50 y C100 se presentan en la Figura 2. Las muestras se seleccionaron para detectar variaciones de acuerdo con el cambio de composición al incrementar la cantidad de colágeno como fuente de nitrógeno y disminuir la cantidad de músculo.

Se identificaron las bandas de absorción características de proteínas (Djellouli et al., 2019; Ling et al., 2020), correspondientes a la banda Amida A (3262 cm^{-1}) que indica la presencia de N-H/O-H stretching and bending, banda Amida I (1650 cm^{-1}) correspondiente a C=O stretching, banda Amida II (1546 cm^{-1}) correspondiente a N-H bending y C-N stretching, así como la banda Amida III (1276 cm^{-1}) que representa una banda compleja resultado de diversos desplazamientos (Ling et al., 2020), así como bandas de absorción que sugieren la presencia de anillos aromáticos en 1582 cm^{-1} (correspondiente a C=N stretching and C=C bending vibrations) y en 756 cm^{-1} y 856 cm^{-1} (relacionadas con aromatic C-H bending vibrations) (Barth, 2000; Djellouli et al., 2019). Por otro lado, bandas presentes en 1510 cm^{-1} , 1392 cm^{-1} , 1198 cm^{-1} , coinciden con lo reportado por Verma et al. (2020), correspondientes a un surfactante producido por *Bacillus subtilis* utilizando melazas como único nutriente. Con esto se podría decir que los productos encontrados en el presente estudio se presumen como compuestos aromáticos y que pueden contribuir en la capacidad antioxidante demostrada en los análisis realizados.

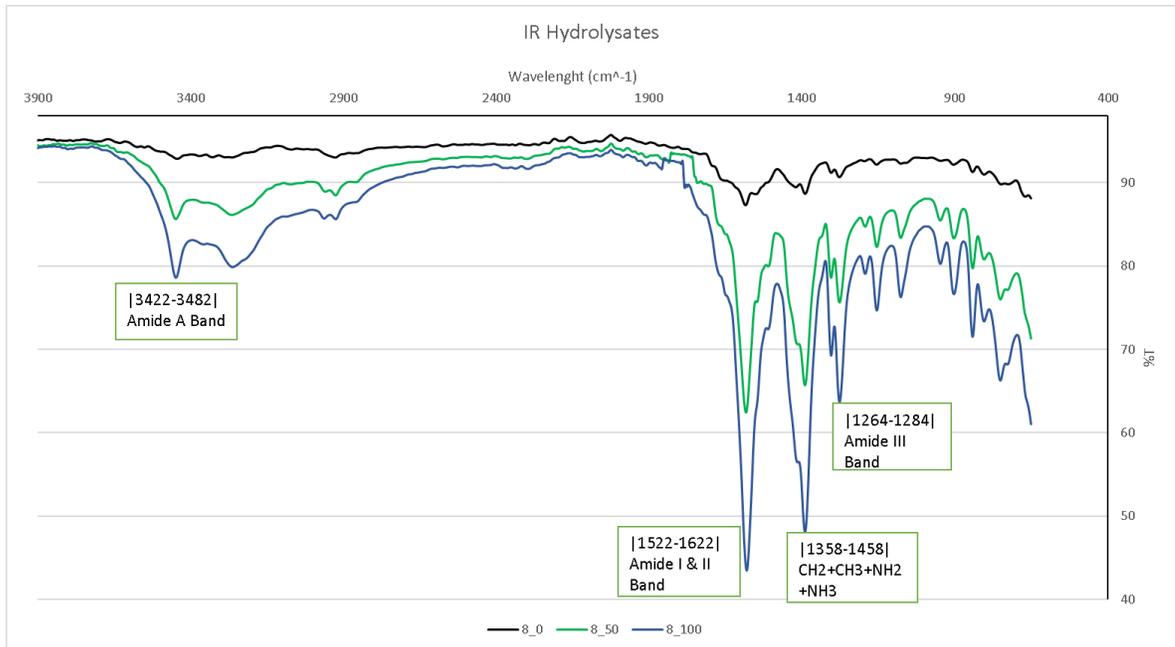


Figura 15. Espectro IR de hidrolizados obtenidos de C0, C50 y C100 después de 8 horas de fermentación.

6.11. Bioactividad in vitro

Recientemente el desarrollo de hidrolizados de proteína de pescado se ha dirigido a su aplicación como coadyuvantes en la estabilidad de los alimentos a los que se agregan y a los posibles efectos benéficos que puedan tener sobre la salud, en este sentido se han utilizado pruebas in vitro para evaluar el efecto inhibitorio sobre algunas enzimas de importancia en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, como obesidad, diabetes, hipertensión, etc. (Gao et al., 2021).

La bioactividad in vitro de los hidrolizados se muestra en la Tabla 5. El ensayo ORAC se utilizó para medir la capacidad de romper la reacción en cadena de radicales peroxilo, encontrándose valores de 215.44-742.17 $\mu\text{mol TE/g sample}$, Idowu et al. (2019) reportaron 544.25-840.03 $\mu\text{mol TE/g sample}$ en hidrolizados obtenidos a partir de salmon frames utilizando alcalasa y papaína.

Tabla 5. Bioactividad *in vitro* de hidrolizados de proteína de *Dosidicus gigas* obtenidos vía fermentación con *Bacillus subtilis* ATCC 6633

	μmol Trolox Eq /g	% Inhibición	% Inhibición	% Inhibición	% Inhibición
Muestra	ORAC	α -amilasa	α - glucosidasa	Lipasa	Convertidora de Angiotensina 1
4-C25	337.70 _c	12.69 _b	78.52 _c	25.46 _c	62.2 _c
4-C100	383.59 _d	16.17 _c	80.76 _c	<u>34.68_d</u>	71.85 _d
8-C0	215.44 _a	9.7 _a	44.84 _a	11.16 _a	22.11 _a
8-C50	<u>742.17_e</u>	<u>20.87_d</u>	<u>93.29_d</u>	<u>35.44_d</u>	<u>88.96_e</u>
8-C100	266.88 _b	13.83 _b	62.42 _b	19.38 _b	48.73 _b

Diferentes letras en la misma columna indicant diferencias significativas ($p < 0.05$).

Un acercamiento importante para el control de peso es reducir o ralentizar la digestión de carbohidratos y su absorción, la digestión primaria de almidón ocurre a través de la acción de α -amilasa, que posteriormente termina de hidrolizarse por α -glucosidasas para liberar monosacáridos absorbibles, inhibir estas dos enzimas retarda significativamente la hiperglicemia postprandial y la producción de energía (Liu et al., 2013). Para los hidrolizados (40mg/mL) se obtuvieron resultados de inhibición para α -amilasa de 9.7-20.87%, y para inhibición de de 44.84-93.29%, mientras que Acarbosa (1mM) tuvo valores de 43.25% y 76.37% para control de α -amilasa y α -glucosidasa respectivamente. Resultados similares fueron reportados por Liu et al. (2013) para inhibición de α -amilasa entre 11.36-20.83% para hidrolizados de crucian carp (*Carassius carassius*) utilizando alkaline protease.

En el metabolismo de lípidos se involucra un gran número de enzimas, la lipasa pancreática es considerada una enzima clave para la digestión de triglicéridos, por ello la inhibición de lipasa es una forma eficiente de prevenir obesidad, lo cual es

uno de los métodos más importantes para evaluar la actividad anti-obesidad in vitro (Liu et al., 2013; Tacias-Pascacio et al., 2021). Los hidrolizados presentaron valores de inhibición de lipasa entre 11.16-35.44%, Orlistat (1mg/mL) presentó un 95.55% de inhibición. Liu et al. (2013) reportaron inhibición de lipasa entre 25.63-54.16% para hidrolizados de crucian carp (*Carassius carassius*) utilizando alkaline protease.

Uno de los sistemas considerados para mantener la homeostasis en presión sanguínea y balance de fluidos-sal es el sistema renina-angiotensina. La enzima convertidora de angiotensina 1 (ACE-I) es un factor llave en este sistema para regular la presión sanguínea, en otras palabras, la inhibición de esta enzima es un método aplicable para el control de hipertensión (Hajfathalian et al., 2017). La inhibición de enzima convertidora de angiotensina obtenida para los hidrolizados (40mg/mL) fue de 22.11-88.96%, Captopril (1mg/mL) tuvo un control de ACE-1 87.23%. Korczek et al. (2019) reportó resultados de ACE-inhibition para hidrolizados usando Alcalase® sobre mackerel (*Scomber scombrus*), sometido a diversos procesos térmicos, entre 60.4-77.9%

Rivero-Pino (2020) menciona que la composición de la matriz alimentaria puede ser relevante al considerar la funcionalidad de los hidrolizados al adicionarse a la formulación, cabe resaltar que, a pesar de que se tienen valores de inhibición de enzimas relevantes en el tratamiento de enfermedades crónicas por debajo del control, presenta propiedades suficientes que lo hace coadyuvante en el tratamiento de personas con dichas enfermedades y resultaría adecuado su empleo como nutraceútico.

6.12. Desarrollo del embutido

Los embutidos obtenidos (Figura 16) se empacaron en bolsas de polietileno de alta densidad con ayuda de vacío y se almacenaron en refrigeración hasta su análisis.



Figura 16. Embutidos de calamar gigante, control y adicionados con hidrolizados

6.13. Evaluación del embutido durante la vida útil

6.13.1. Análisis inicial

El embutido de calamar gigante presentó $65.48\% \pm 0.91\%$ de humedad, $16.87\% \pm 0.56\%$ de proteína, $6.56\% \pm 0.22\%$ de lípidos, $3.57\% \pm 0.33\%$ de fibra, $1.34\% \pm 0.26\%$ de cenizas, y 6.18% de carbohidratos por diferencia. Se determinaron coliformes <3 MPN/g, *S. aureus* ausente en 25 g y *Salmonella* spp. ausente en 25 g. Zhou et al. (2017) reportó para un embutido de calamar adicionado con manteca de cerdo valores de humedad similar (64.07%), menor contenido de proteína (14.53%) y mayor contenido de grasa (13.39%), probablemente debido a la formulación, ya que utilizan menor porcentaje de calamar y mayor de grasa. La determinación de microorganismos indicadores se realizó para determinar la manipulación higiénica del producto y excluir su posible efecto en el desarrollo del embutido.

6.13.2. Almacenamiento

Las muestras control al día 23 de almacenamiento presentaron características no propias del producto, específicamente color, olor y textura fuera de las aceptadas para el consumo (Figura 17).



Figura 17. Embutidos control y adicionado con hidrolizados (H) en día 22 de almacenamiento

Durante 43 días de almacenamiento la acidez no presentó diferencias significativas, por lo que no se consideró una variable importante para indicar el deterioro en este producto (Figura 18).

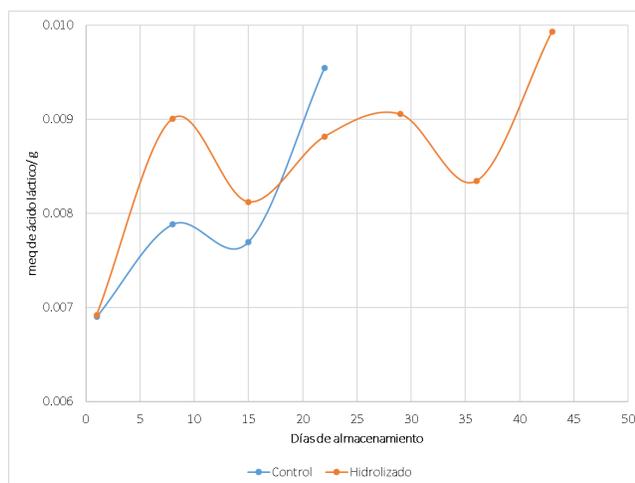


Figura 18. Valores de acidez de los embutidos control y adicionado con hidrolizados durante el almacenamiento

En la Figura 19 (pH, BVT, CRA) se observan diferencias en el comportamiento del embutido adicionado con los hidrolizados respecto al control.

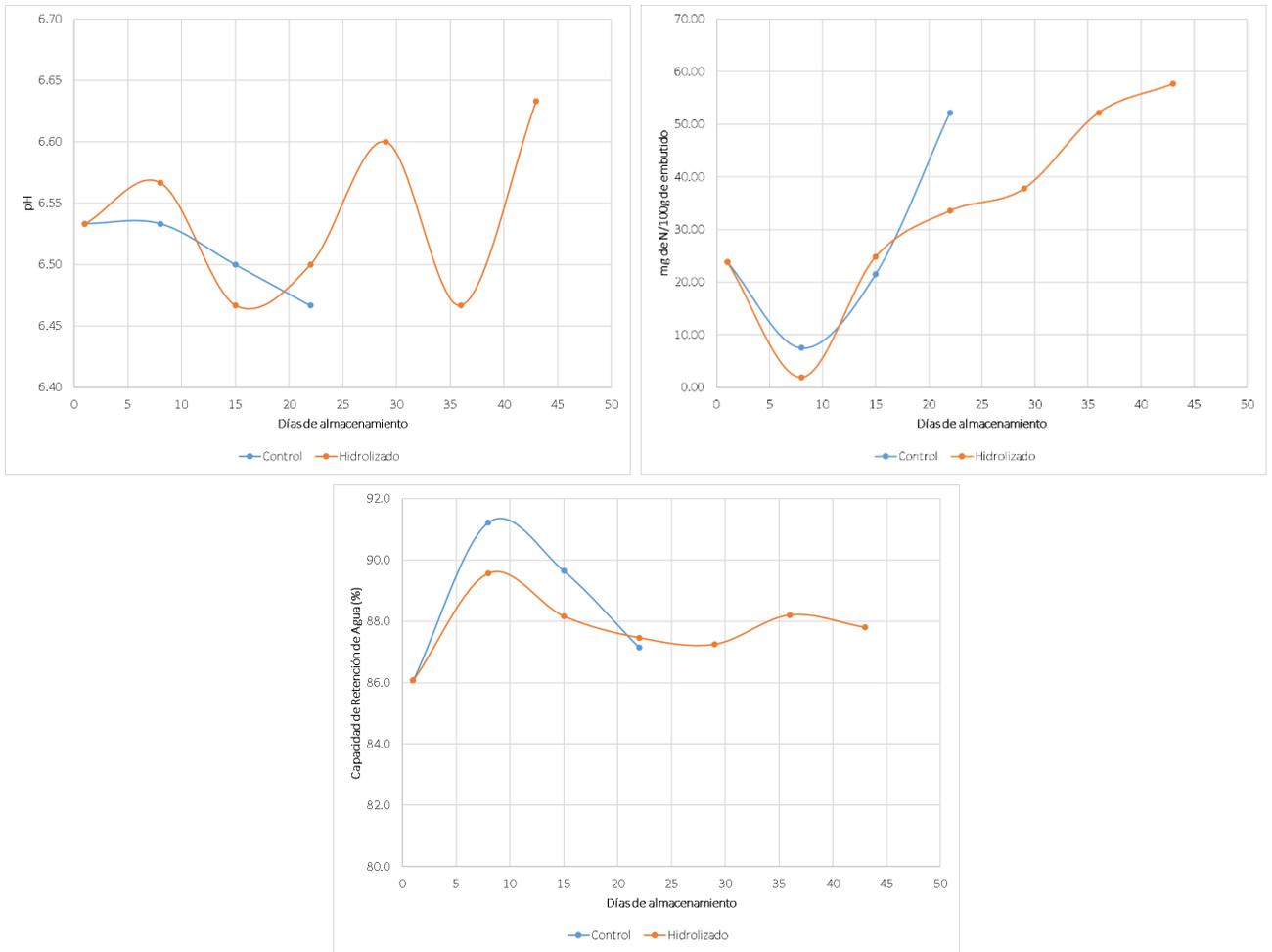


Figura 19. Valores de pH, BVT y CRA de los embutidos control y adicionado con hidrolizados durante el almacenamiento

La muestra control presenta disminución en el valor de pH al incrementarse el tiempo de almacenamiento, mientras que la muestra adicionada con hidrolizado presenta variaciones (de 6.47 ± 0.03 a 6.63 ± 0.07), esto puede ser debido a que la presencia de hidrolizados modifica el comportamiento del embutido, la desaminación de proteínas y producción de compuestos de nitrógeno de bajo peso molecular (dimetilamina, trimetilamina, entre otros) debidas al crecimiento de microorganismos (Verma et al., 2018).

La producción de BVT de ambos embutidos presenta una disminución durante la primera semana de almacenamiento, asociada con ajustes propios del producto durante el almacenamiento, a partir del día 15 siguen una tendencia a incrementarse con el tiempo habiendo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los valores del embutido adicionado con el hidrolizado y los valores del embutido sin hidrolizado a partir del día 22, esto podría relacionarse con la producción de metabolitos por microorganismos de deterioro de productos marinos presentes como *Sheranella putrefaciens*, *Pseudomonas* spp., *Psychrobacter*, etc. (Odeyemi et al., 2018), ya que de acuerdo con Riebroy et al. (2007), la formación de bases volátiles totales es generalmente asociada al crecimiento de microorganismos y puede ser usada como un indicador de deterioro, las bases volátiles totales incluyen principalmente trimetilamina y amoniaco, los cuales son producidos por acción de enzimas microbianas y endógenas (Odeyemi et al., 2018).

La CRA presenta un periodo de ajuste hasta el día 15 (incremento y decremento), posteriormente no presenta diferencias significativas hasta el final del almacenamiento, esto podría relacionarse a la presencia de fibra de cítricos, que coadyuva a retener el líquido en el embutido, por el contenido de hemicelulosa, celulosa y pectina, en particular la hemicelulosa tiene una excelente capacidad de atrapar agua por su estructura no cristalina y amorfa, lo que mejora la absorción y reduce la pérdida por cocción (Sharaf Eddin et al., 2020).

En cuanto a color (Tabla 6), la luminosidad disminuye ($p < 0.05$) durante el almacenamiento con los valores menores en H43 y C22, mientras que en el caso de a^* el valor se incrementa ($p < 0.05$) durante el almacenamiento, con los valores más altos en H43 y C22. En el valor de b^* no se observan diferencias significativas entre B y H22, sin embargo el valor de b^* se incrementa ($p < 0.05$) en C22 y H43. El comportamiento en L^* y b^* se puede relacionar al proceso de rancidez (Luo et al., 2018) y a la formación de productos de Maillard durante el

almacenamiento, favoreciéndose pigmentos cafés, debido a la presencia de maltodextrina como fuente de azúcares reductores, mientras que la presencia de los hidrolizados como antioxidante disminuye la velocidad de generación de color por esta vía (Starowicz and Zieliński, 2019).

Tabla 6. Valores de color obtenidos para los embutidos al inicio del almacenamiento (B), al día 22 (C y H) y al día 43 (H).

Muestra	L*	a*	b*
B	74.32 ± 0.04 d	7.13 ± 0.02 a	34.51 ± 0.01 a
C22	72.80 ± 0.02 a	7.70 ± 0.02 c	35.12 ± 0.02 b
H22	73.17 ± 0.02 c	7.50 ± 0.01 b	34.59 ± 0.06 a
H43	72.98 ± 0.05 b	7.9 ± 0.03 d	35.27 ± 0.03 c

Promedio ± Desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indicant diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$).

Análisis microbiológico

Las cuentas microbianas de las muestras con y sin hidrolizado se muestran en la Figura 20, la cuenta incrementó significativamente durante el almacenamiento ($p < 0.05$). En ambas gráficas (CTV and CBP) se observa una disminución en la cuenta microbiana al día 8 de almacenamiento, de acuerdo con Odeyemi et al. (2018) la presencia de distintas especies de bacterias de deterioro en una matriz alimentaria marina puede provocar inhibición de crecimiento entre ellas, a partir del día 15 las muestras control presentan un incremento ($p < 0.05$) constante de la cuenta microbiana y las muestras adicionadas con hidrolizados mantienen la tendencia a disminuir la cuenta microbiana hasta el día 22 de almacenamiento, esto indicaría que la presencia de hidrolizados retarda el deterioro microbiano de las salchichas, similar al efecto encontrado por Hajfathalian et al. (2019) que utilizaron common carp roe hydrolysate on a silver carp sausage. Este efecto inhibidor de crecimiento microbiano se debe probablemente a que los péptidos

pequeños presentes en los hidrolizados poseen la capacidad de interactuar con la membrana celular bacteriana, dichas interacciones pueden ocasionar la generación de canales en la bicapa lipídica, separación de fases a través de interacciones péptido-lípido, y una solubilización similar a un detergente en la membrana microbiana (Hajfathalian et al., 2019), a partir del día 29 se observa un incremento ($p < 0.05$) en la cuenta, sin embargo, al término del estudio (43 días) se mantuvo por debajo de los límites reportados por Hajfathalian et al. (2019) en salchichas de carpa plateada (5 Log UFC/g, 30 días), siendo de TVC 3.68 Log UFC/g y PBC 3.78 Log UFC/g. No se detectó la presencia de bacterias coliformes durante el almacenamiento de las muestras (Tabla 7).

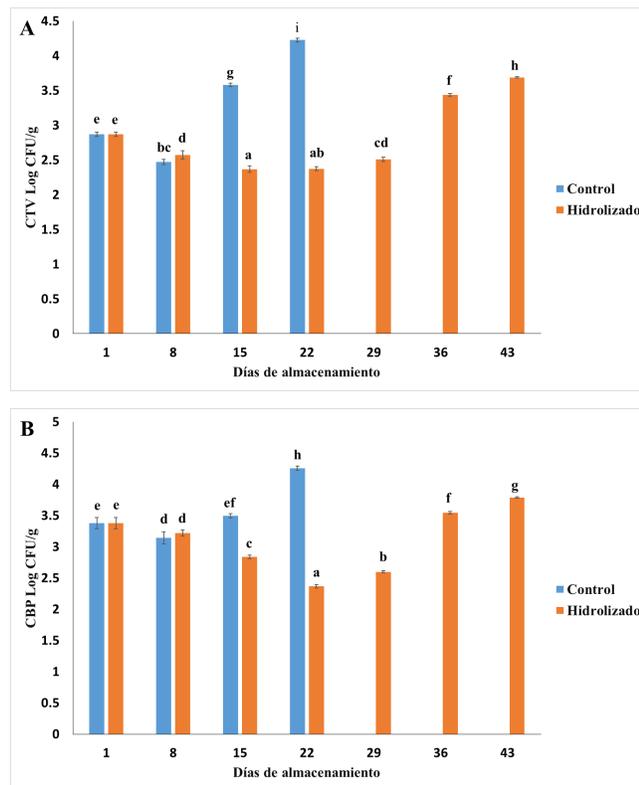


Figura 20. A) Cuenta Total Viable (CTV) y B) Cuenta de Bacterias Psicrófilas (CBP) de los embutidos control y adicionado con hidrolizados durante el almacenamiento. Promedios \pm Desviación estándar, letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 7. Coliformes totales en los embutidos control y adicionado con hidrolizados durante el almacenamiento

Coliformes Totales		
Dia	Control	Hidrolizado
1	<100	<100
8	<100	<100
15	<100	<100
22	<100	<100
29		<100
36		<100
43		<100

7. Conclusiones

Los hallazgos de este estudio demostraron que el calamar almacenado en congelación por tiempos prolongados resultó una buena materia prima para la obtención de hidrolizados bioactivos, teniendo un rendimiento de 3.2g/100mL utilizando a *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Todos los hidrolizados obtenidos presentaron capacidad de formación de espuma y resistencia al colapso de las burbujas, aunado a esto, el análisis infrarrojo reveló la presencia de metabolitos secundarios con posibles propiedades surfactantes, relacionándose con el incremento en los índices de actividad y estabilidad emulsionante. Se observó actividad proteolítica con posibles aplicaciones en la tenderización cárnica. Este estudio además de demostrar buenas propiedades funcionales identificó un incremento en la actividad antioxidante por la posible presencia de anillos aromáticos en los fragmentos proteicos capaces de atrapar radicales libres; la actividad antimicrobiana demostró una inhibición efectiva frente a bacterias Gram negativas. Por lo tanto, los hidrolizados obtenidos bajo condiciones específicas de fermentación podrían ser utilizados en formulaciones alimenticias y farmacéuticas.

Los hidrolizados de proteína del manto de calamar gigante presentaron capacidad para romper la reacción en cadena de radicales peroxilo, así como inhibición de enzimas α -amilasa, α -glucosidasa, lipasa y ACE-1, las cuales están relacionadas con los tratamientos de enfermedades crónico-degenerativas, por lo que este hidrolizado podría ser un coadyuvante para consumidores con dichos trastornos. Las salchichas de calamar

gigante presentan un perfil bromatológico en el cual gracias a las características propias de esta especie el contenido de proteína es superior al reportado en literatura, así como menor porcentaje de grasa, lo que lo hace un alimento potencialmente nutritivo, dado que es susceptible al deterioro enzimático y microbiano, fue posible su uso como matriz alimenticia para la prueba de efectividad de hidrolizados, observándose que hubo un control sobre el crecimiento de microorganismos y la producción de metabolitos, prolongando así su vida útil hasta 43 días, así mismo, logró disminuir el pardeamiento del producto durante el almacenamiento. Por lo tanto, los hidrolizados obtenidos a partir de esta especie de importancia económica utilizando *Bacillus subtilis*, pueden ser utilizados como aditivos para la mejora de la estabilidad durante el almacenamiento de embutidos a partir de especies acuícolas-marinas que son susceptibles al deterioro enzimático y microbiano, siendo una alternativa para la disminución del uso de conservantes.

Bibliografía.

- Abdelmoteleb, A., Troncoso-Rojas, R., Gonzalez-Soto, T., & González-Mendoza, D. (2017). Antifungal activity of autochthonous *Bacillus subtilis* Isolated from *Prosopis juliflora* against phytopathogenic fungi. *Mycobiology*, 45(4), 385–391.
- Agrawal, H., Joshi, R., Gupta, M. (2016). Isolation, purification and characterisation of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate, *Food Chemistry*, 204, 365-372.
- AOAC. (2000). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. Gaithersburg (17th ed.).
- Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin cloth formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 31:3, 488-494.
- Barth, A. (2000). The infrared absorption of amino acid side chains. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 74, 141-173.
- Bekhit, A. E. A., Carne, A., Ryder, K., Ha, M. and Kong, L. (2017). Manipulation of meat structure: Use of exogenous proteases. In Bekhit A. E. A. (Ed). *Advances in meat processing technology*, p. 65-109, Boca Raton, FL: CRC Press.
- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F. & Montero, P. (2014). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. *Journal of Food Science and Technology*, 55, 543-550.
- Cam-Van T. Vo, Nhan V. H. Luu, Thoai T. H. Nguyen, Truc T. Nguyen, Bach Q. Ho, Thuong H. Nguyen, Thanh-Dao Tran & Quoc-Thai Nguyen. (2022). Screening for pancreatic lipase inhibitors: evaluating assay conditions using p -nitrophenyl palmitate as substrate. *All Life*, 15:1, 13-22.
- Carranco-Jáuregui, M., Fuente-Martínez, B., Ramírez-Poblano, M, Calvo-Carrillo, M. & Ávila-González, E. 2020. Inclusión de harina de calamar gigante *Dosidicus gigas* como fuente de proteína en dietas para gallinas ponedoras. *Abanico Veterinario*, 10, 1-12.
- Cauller, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10, 302.

- Chan, J.C.K. & Li-Chan, E.C.Y. 2006. Antimicrobial peptides. In: *Nutraceutical Proteins and Peptides in Health and Disease* (Y. Mine and F. Shahidi, Eds.), Boca Raton, FL: Taylor & Francis, pp. 99–136.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Dimitrov, K., Guez, J.-S., Delvigne, F., Dhulster, P., & Jacques, P. (2017). Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. *Biotechnology Journal*, 12(7), 1600566.
- Cudic, M. & Otvos, L.J. 2002. Intracellular targets of antibacterial peptides. *Curr. Drug Targets*, 3, 101–106.
- Ding, L., Lu, L., Sheng, L., Tang, C., Chen, Y., & Cai, Z. (2020). Mechanism of enhancing foaming properties of egg white by super critical carbon dioxide treatment. *Food Chemistry*, 317, 126349.
- Djellouli, M., López-Caballero, M. E., Arancibia, M. Y., Karam, N., & Martínez-Alvarez, O. (2019). Antioxidant and antimicrobial enhancement by reaction of protein hydrolysates derived from shrimp by-products with glucosamine. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 2491–2505.
- Elumalai, P., Lim, J.M., Park, Y.J., Cho, M., Shea, P.J. and Oh, B.T. (2020). Agricultural waste materials enhance protease production by *Bacillus subtilis* B22 in submerged fermentation under blue light-emitting diodes. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 821-830.
- Felix, A. K. N., Martins, J. J. L., Almedia, J. G. L., Giro, M. A. E., Cavalcante, K. F., Melo, V. M. M., Pessoa, O. D. L., Rocha, M. V. P., Gonçalves, L. R. B. and Aguiar, R. S. S. (2019). Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 175, 256-263.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lucas-Lopez, R., and Ben-Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol*, 120:1–2, 51-70.
- Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., Yang, M., Yuan, L., McClements, D. J. and Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends of Food Science and Technology*, 110, 689-699.
- Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A. Giménez, B. and Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. In Le Bihan, E. (Ed). *Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application*, p. 89-115. Transworld Research Network.

- Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García-Moreno, P. J., Moltke Sørensen, A.-D., & Jacobsen, C. (2017). Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58:18, 3097-3129.
- Hajfathalian, M., Jorjani, S., & Ghelichi, S. (2019). Characterization of fish sausage manufactured with combination of sunflower oil and fish oil stabilized with fish roe protein hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 1439–1448.
- Hassan, S.W.M. and Ibrahim H.A.H. (2017). Production, characterization and valuable applications of exopolysaccharides from marine *Bacillus subtilis* SH 1. *Polish Journal of Microbiology*, 66:4, 449-461.
- Hoffmann, M., Mück, D., Grossmann, L., Greiner, L., Klausmann, P., Henkel, M., Lilge, L., Weiss, J. and Hausmann, R. (2021). Surfactin from *Bacillus subtilis* displays promising characteristics as O/W-emulsifier for food formulations. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 203, 111749.
- Hussain, T., Haris, M., Shakeel, A., Ahmad, G., Ahmad Khan, A., & Khan, M. A. (2020). Bio-nematicidal activities by culture filtrate of *Bacillus subtilis* HussainT-AMU: new promising biosurfactant bioagent for the management of Root Galling caused by *Meloidogyne incognita*. *Vegetos*, 33:2, 229–238.
- Idowu, A. T. and Benjakul, S. (2019). Bitterness of fish protein hydrolysates and its debittering prospects. *Journal of Food Biochemistry*, 43, e12978.
- Idowu, A. T., Igiehon, O. O., Idowu, S., Olatunde, O. O. and Benjakul, S. (2021). Bioactivity potentials and general applications of fish protein hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 27, 109-118.
- INAPESCA, 2019. Evaluación acústica de Calamar Gigante (*Dosidicus gigas*) en el Golfo de California durante la primavera de 2019. Campaña Océano Pacífico 2019, Informe Técnico No. 3, 8-9.
- ISO 21528-2. (2007). Microbiology of the food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of Enteriobacteriaceae – Part 2: Colony-count technique.
- Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Slama-Ben Salen, R. B., Mehiri, M., Hajji, M. & Nasri, M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Journal of Process Biochemistry*, 49:6, 963-972.
- Jia, J., Ji, B., Tian, L., Li, M., Lu, M., Ding, L., Liu, X. and Duan, X. (2020). Mechanism study on enhanced foaming properties of individual albumen proteins by *Lactobacillus* fermentation. *Food Hydrocolloids*, 111, 106218.

- Kai, M. (2020). Diversity and distribution of volatile secondary metabolites throughout *Bacillus subtilis* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11, 559.
- Kannan, A., Hettiarachchy, N. & Marshall, M. (2012). Food proteins and peptides as bioactive agents. En *Bioactive Food Proteins and Peptides: applications in human health*. Herriarachchy, N., Sato, K., Marshall, M. R. & Kannan A. (Eds). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Karami, Z., & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 535-547.
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019). Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *Journal of Natural Products*, 82:7, 2038-2053.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 1317-1327.
- Korczek, K.R., Tkaczewska, J., Duda, I. and Migdał, W. (2019). Effect of heat treatment on the antioxidant and antihypertensive activity as well as in vitro digestion stability of mackerel (*Scomber scombrus*) protein hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29:1, 73–89.
- Ling, Z., Ai, M., Zhou, Q., Guo, S., Zhou, L., Fan, H., Cao, Y. and Jiang, A. (2020). Fabrication egg white gel hydrolysates-stabilized oil-in-water emulsion and characterization of its stability and digestibility. *Food Hydrocolloids*, 102, 105621.
- Ling Ho, L. (2015). Xylanase production by *Bacillus subtilis* using carbon source of inexpensive agricultural wastes in two different approaches of submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SsF). *Journal of Food Processing and Technology*, 6:4, 1000437.
- Liu, Y., Li, X., Chen, Z., Yu, J., Wang, F., & Wang, J. (2014). Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry*, 151, 459-465.
- Liu, L., Wang, Y., Peng, C. and Wang, J. (2013). Optimization of the Preparation of Fish Protein Anti-Obesity Hydrolysates Using Response Surface Methodology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 3124-3139.

- Lu, H., Luo, Y., & Feng, L. (2013). Effects of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) scales on rancidity stability and gel properties of fish products. *Food and Bioprocess Technology*, 7:8, 2178–2188.
- Luo, A., Feng, J., Hu, B., Lv, J., Liu, Q., Nan, F., Chen, C. Y. O. and Xie, S. (2018). *Arthrospira (Spirulina) platensis* extracts improves oxidative stability and product quality of Chinese-style pork sausage. *Journal of Applied Phycology*, 30, 1667-1677.
- Marti-Quijal, F. J., Remize, F., Meca, G., Ferrer, E., Ruiz, M. J. and Barba, F. J. (2020). Fermentation in fish and by-products processing: an overview of current research and future prospects. *Current Opinion in Food Science*, 31, 9-16.
- Mhina, C. F., Jung, H. Y. and Kim, J. K. (2020). Recovery of antioxidant and antimicrobial peptides through the reutilization of Nile perch wastewater by biodegradation using two *Bacillus* species. *Chemosphere*, 253, 126728.
- Mirzapour-Kouhdasht, A., Moosavi-Nasab, M., Yousefi, R. and Eun, J.B. (2021). Bio/multi-functional peptides derived from fish gelatin hydrolysates: Technological and functional properties. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102152.
- Nagao, J.I., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K.I., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2006). Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 139–149.
- Odeyemi, O. A., Burke, C. M., Bolch, C. C. J. and Stanley, R. (2018). Seafood spoilage microbiota and associated volatile organic compounds at different storage temperatures and packaging conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 280, 87-99.
- Okita, A., Takahashi, K., Itakura, M., Horio, A., Yamamoto, R., Nakamura, Y. and Osako, K. (2020). A novel soft surimi gel with functionality prepared using alcalase for people suffering from dysphagia. *Food Chemistry*, 344, 128641.
- Olishavska, S., Nickzad, A., & Déziel, E. (2019). *Bacillus* and *Paenibacillus* secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 1189-1215.
- Orhan, E., Omay, D. and Güvenilir, Y. (2005). Partial Purification and Characterization of Protease Enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121:1-3, 0183–0194.
- Patrzykat, A. and Douglas, S. (2005). Antimicrobial peptides: cooperative approaches to protection. *Protein and Peptide Letters*, 12:1, 19–25.
- Picos-Salas, M. A., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Valdez-Torres, B., Angulo-Escalante, M. A., López-Martínez, L. X., Delgado-Vargas, F. and Heredia, J. B. (2021). Supercritical CO₂

extraction of oregano (*Lippia graveolens*) phenolic compounds with antioxidant, α -amylase and α -glucosidase inhibitory capacity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 3480-3490.

- Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., & Korhonen, H. (2000). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res*, 67:1, 53–64.
- Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Tanaka, M. (2007). Effect of iced storage of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) on the chemical composition, properties and acceptability of Som-fug, a fermented Thai fish mince. *Food Chemistry*, 102, 270-280.
- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F. J. and Guadix, E. M. (2020). Evaluation of the bioactive potential of foods fortified with fish protein hydrolysates. *Journal of Food Research International*, 137, 109572.
- Rocha, P. M., Mendes, A. C. S., Júnior, S. D. O., Padilha, C. E. A., Sá Leitão, A. L. O., Nogueira, C. C., Macedo, G. R. and dos Santos, E. S. (2021). Kinetic study and characterization of surfactin production by *Bacillus subtilis* UFPEDA 483 using sugarcane molasses as carbon source. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 51:3, 300-308.
- Rutherford-Markwick, K.J. & Moughan, P.J. 2005. Bioactive peptides derived from food. *J. AOAC Intl*, 88, 955–966.
- Rydlo, T., Miltz, J., and Mor, A. 2006. Eukaryotic antimicrobial peptides: Promises and premises in food safety. *J. Food Sci.* 71: R125–R135.
- Saallah, S., Ishak, N. H. and Sarbon, N. M. (2020). Effect of different molecular weight on the antioxidant activity and physicochemical properties of golden apple snail (*Ampullariidae*) protein hydrolysates. *Food Research*, 4:4, 1363-1370.
- Sabater, C., Ruiz, L., Delgado, S., Ruas-Madiedo, P. and Margolles, A. (2020). Valorization of Vegetable Food Waste and By-Products Through Fermentation Processes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581997.
- Sae-leaw, T., O’Callaghan, Y. C., Benjakul, S. and O’Brien, N. M. (2016). Antioxidant activities and selected characteristics of gelatin hydrolysates from seabass (*Lates calcarifer*) skin as affected by production processes. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 197-208.
- Sallam, K.I. (2007). Antimicrobial and antioxidant effects of sodium acetate, sodium lactate, and sodium citrate in refrigerated sliced salmon. *Food Control*, 18, 566–575.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. 2008. Bioactive peptides. *J. AOAC Intl*, 91:4, 914–931.

- Sharaf Eddin, A., Adegoke, S., Issa, A. T., Wilson, C., & Tahergorabi, R. (2020). Physicochemical Changes of Surimi Gels with Addition of Different Particle Sizes of Citrus Peel Fiber. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29:10, 1029–1040.
- Siewe, F.B., Kudre, T.G., Bettadaiah, B.K. and Bhaskar, N. (2020). Effects of ultrasound-assisted heating on aroma profile, peptide structure, peptide molecular weight, antioxidant activities and sensory characteristics of natural fish flavouring. *Ultrasonics Sonochemistry*, 65, 105055.
- Singh, A., & Benjakul, S. (2018). Proteolysis and its control using protease inhibitors in fish and fish products: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17:2, 496–509.
- Starowicz, M. and Zieliński, H. (2019). How Maillard Reactions Influences Sensorial Properties (Color, Flavor and Texture) of Food Products? *Food Reviews International*, 35:8, 707-725.
- Tacias-Pascacio, V. G., Castañeda-Valbuena, D., Morellon-Sterling, R., Tavano, O., Berenguer-Murcia, A., Vela-Gutiérrez, G., Rather, I. A. and Fernández-Lafuente, R. (2021). Bioactive peptides from fisheries residues: A review of use of papain in proteolysis reactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 184, 415-428.
- Uddin, M.E., Ahmad, T., Ajam, M.M., Moniruzzaman, M., Mandol, D., Ray, S.K., Sufian, A., Rahman, M.A. Hossain, E. and Ahammed, T. (2017). Thermotolerant extracellular proteases produced by *Bacillus subtilis* isolated from local soil that representing industrial applications. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11:2, 733-741.
- Valenzuela-Ávila, L., Miliar, Y., Moya-Ramírez, I., Chyhyrynets, O., García-Román, M. & Altmajer-Vaz, D. (2019). Effect of emulsification and hydrolysis pretreatments of waste frying oil on surfactin production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 95:1, 223-231.
- Verma, A. K., Chatli, M. K., Mehta, N., & Kumar, P. (2018). Assessment of physico-chemical, antioxidant and antimicrobial activity of porcine blood protein hydrolysate in pork emulsion stored under aerobic packaging condition at 4 ± 1 °C. *LWT*, 88, 71–79.
- Verma, R., Sharma, S., Kundu, L. M., & Pandey, L. M. (2020). Experimental investigation of molasses as a sole nutrient for the production of an alternative metabolite biosurfactant. *Journal of Water Process Engineering*, 38, 101632.

- Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J., & Yang, L. (2015). Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23:4, 744-754.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. and Bienert, M. (1997). Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry*, 36:42, 12869-12880.
- Yuliani, H., Perdani, M. S., Savitri, I., Manurung, M., Sahlan, M., Wijanarko, A., & Hermansyah, H. (2018). Antimicrobial activity of biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* C19. *Energy Procedia*, 153, 274–278.
- Zamorano-Apodaca, J. C., García-Sifuentes, C. O., Carvajal-Millán, E., Vallejo-Galland, B., Scheuren-Acevedo, S. M. and Lugo-Sánchez M. E. (2020). Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish species. *Food Chemistry*. 331, 127350.
- Zhou, T., Zhao, Y., Wu, X., Wang, W., & Liu, A. (2017). Production of squid emulsion sausages using pork skin and coconut powder mixture as fat replacers. *International Journal of Food Science & Technology*, 53:3, 747–754.
- Zhou, T., Zhao, Y., Fu, S., Wang, W., & Liu, A. (2018). Effects of Pig Skin and Coconut Powder Mixture on Gelling and Rheological Properties of Composite Gel Prepared with Squid Myofibrillar Protein and Lard. *International Journal of Food Engineering*, 14:1, 20170265.

Tabla de promedios y desviaciones estándar para los datos de las superficies de respuesta:
actividad antioxidante y proteína soluble.

Tratamiento	Actividad antioxidante ABTS•+ (mg eq AA/mL)		Actividad antioxidante DPPH• (µg eq AA/mL)		Proteína soluble (mg/mL)	
	Media	Letras	Media	Letras	Media	Letras
0-C0	2.609±0.043	abcd	365.906±60.696	abc	3.475±0.208	a
0-C100	2.582±0.031	abcd	333.924±38.225	abc	5.921±0.035	gh
0-C25	2.689±0.050	abcde	385.374±63.863	abcd	3.859±0.174	a
0-C50	2.567±0.073	abc	439.604±29.813	abcde	4.731±0.191	bcde
0-C75	2.597±0.022	abcd	353.392±28.486	abc	5.512±0.082	fgh
2-C0	2.536±0.016	ab	243.541±10.529	a	3.786±0.015	a
2-C100	2.425±0.012	a	326.972±22.074	abc	6.146±0.134	h
2-C25	2.557±0.026	ab	354.782±17.952	abc	4.023±0.052	ab
2-C50	2.467±0.016	a	301.942±27.437	abc	4.683±0.174	bcde
2-C75	2.525±0.029	ab	386.764±31.248	abcd	5.369±0.062	efgh
4-C0	2.616±0.022	abcde	288.037±16.763	abc	3.484±0.085	a
4-C100	2.452±0.086	a	339.486±12.515	abc	5.382±0.173	efgh
4-C25	2.721±0.043	abcde	393.717±17.952	abcd	4.187±0.210	abcd
4-C50	2.584±0.052	abcd	283.866±9.465	ab	4.808±0.194	cdef
4-C75	2.601±0.033	abcd	356.173±21.467	abc	5.512±0.104	fgh
6-C0	2.947±0.015	de	336.705±57.820	abc	3.523±0.063	a
6-C100	2.870±0.093	bcde	482.710±27.671	cdef	5.809±0.094	gh
6-C25	2.988±0.008	e	443.775±30.167	bcde	4.114±0.199	abc
6-C50	2.942±0.017	cde	382.593±41.777	abcd	4.817±0.187	cdef
6-C75	2.870±0.052	bcde	482.710±36.225	cdef	5.326±0.117	efg
8-C0	3.836±0.166	f	630.097±43.931	efg	3.743±0.090	a
8-C100	3.950±0.117	f	679.743±42.536	fg	5.745±0.165	gh
8-C25	3.996±0.177	f	648.388±48.721	fg	3.601±0.057	a
8-C50	3.666±0.075	f	564.773±62.475	defg	4.912±0.226	def
8-C75	3.865±0.083	f	750.293±27.155	g	5.727±0.186	gh

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.



UNIVERSIDAD DE
GUANAJUATO

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Francisco Antonio López Medina, Octavio Dublán García, Leobardo M. Gómez Oliván, Leticia X. López Martínez

Por la presentación del trabajo:

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS A PARTIR DE COLÁGENO Y MÚSCULO DE *Dosidicus gigas*: OPTIMIZACIÓN MEDIANTE SUPERFICIE DE RESPUESTA

ID: 13

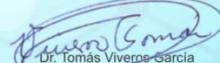
“La Ingeniería Química como motor de la innovación”



XXXIX ENCUENTRO NACIONAL
DE LA AMIDIQ


Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández
PRESIDENTE DEL COMITÉ ORGANIZADOR


Dr. Miguel Ángel Morales Cabrera
PRESIDENTE NACIONAL AMIDIQ


Dr. Tomás Viveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

San José del Cabo, B.C.S., México 1 al 4 de Mayo de 2018



Campus Guanajuato

División de Ciencias
Naturales y Exactas
Departamento de
Ingeniería Química

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C.

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ)

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Francisco A. López-Medina, Leticia Xochitl López-Martínez, Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Octavio Dublán-García, Ana Gabriela Morachis-Valdez, Luis Alberto Cira-Chávez

Por la presentación del trabajo:

OBTENCIÓN DE CARBOHIDRATOS VÍA FERMENTACIÓN CON BACILLUS SUBTILIS ATCC 6633 A PARTIR DE MANTO DE CALAMAR CONGELADO

ID: 910



Dr. Miguel Ángel Morales Cabrera
PRESIDENTE DEL AMIDIQ Y DEL COMITÉ ORGANIZADOR



Dr. Tomás Viveros García
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO



Huatulco, Oaxaca, México 7 al 10 de Mayo de 2019



Extienden la Presente

Constancia

a

Francisco A. López Medina, Leticia X. López Martínez, Leobardo M. Gómez Oliván,
Ma. Dolores Hernández Navarro, Hariz Islas Flores, Octavio Dublán García

Por obtener el **1er lugar** en el concurso de Trabajo de Investigación en modalidad cartel a
Nivel Posgrado en la categoría **Funcionalidad y Nutrición** titulado:

"Obtención de hidrolizados con actividad antimicrobiana, a partir de manto de
calamar gigante congelado"

XI Congreso Internacional "Sobre Inocuidad, Calidad y Funcionalidad de los Alimentos
en la Industria y Servicios de Alimentación"

1 al 5 de Octubre del 2018, Aguascalientes, Aguascalientes.

Dr. Víctor Manuel Toledo López
Presidente Nacional de
SOMEICCA A.C.

Dr. Raúl Ortiz Martínez
Decano del Centro de Ciencias Agropecuarias
Universidad Autónoma de Aguascalientes



Con el apoyo de la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura, FAO.

Extienden la Presente

Constancia



Francisco Antonio López Medina, Leticia Xochitl López
Martínez, Leobardo Manuel Gómez Oliván, Octavio Dublán
García, Alicia Reyes García, Luis Alberto Cira Chávez.

Por su destacada participación con el Trabajo de Investigación titulado:

“Obtención de metabolitos de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y su efecto en
un embutido prototipo.”

XII Congreso Internacional "Sobre Inocuidad, Calidad y Funcionalidad de los Alimentos en la Industria y
Servicios de Alimentación
27 y 28 de septiembre del 2019, Palacio de la Autonomía, CDMX,
Con una duración de 20 h.

Q.A. Esmeralda Paz Lemus
Presidente Nacional
SOMEICCA A.C.

Dra. Ma. Armida Patricia Porras Loaiza
Coordinación Comité Científico
SOMEICCA A.C.