

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

INFLUENCIA DEL PROCESADO Y DE LAS CONDICIONES INTESTINALES SOBRE LA DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LÍPIDOS Y PROTEÍNAS DE SALMÓN

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: MARTA SIERRA LÓPEZ

TUTOR/A ACADEMICO: ANA BELÉN HEREDIA GUTIÉRREZ
COTUTOR/A: ANA MARÍA ANDRÉS GRAU
DIRECTOR EXPERIMENTAL: ANDREA ASENSIO GRAU

Curso Académico: 2018/2019

VALENCIA, 11 de SEPTIEMBRE del 2019

INFLUENCIA DEL PROCESADO Y DE LAS CONDICIONES INTESTINALES SOBRE LA DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LÍPIDOS Y PROTEÍNAS DE SALMÓN

Sierra, M., Asensio-Grau, A.¹, Heredia, A.¹ y Andrés, A.¹

RESUMEN

La insuficiencia pancreática es una afección que se caracteriza por la incapacidad de generar y verter enzimas pancreáticos en la parte duodenal del intestino delgado, ocasionando maldigestión y malabsorción de macronutrientes, en especial de las grasas. La terapia de sustitución enzimática consiste en la ingesta oral de suplementos enzimáticos y la dosis se establece en función del peso corporal del individuo. No obstante, existen otros factores propios del individuo (pH intestinal, concentración de sales biliares, concentración de enzimas, etc.), así como propiedades características del alimento (estructura matricial, tipo de procesado, composición, etc.) que pueden afectar a la digestibilidad de grasas y proteínas del mismo. En el presente trabajo se ha utilizado un modelo *in vitro* estático de digestión gastrointestinal para evaluar el efecto del procesado del salmón sobre la extensión de la lipólisis y proteólisis, analizando asimismo la influencia de diferentes condiciones intestinales pH (6 y 7), concentración de enzimas (0-6000 UL/g grasa) y concentración de sales biliares (1 y 10 mM).

Los resultados revelaron que tanto el tipo de procesado del salmón como las condiciones intestinales afectaron a la digestibilidad de macronutrientes y en mayor medida a los lípidos. Tanto el marinado como el cocinado afectaron a la digestibilidad de lípidos y proteínas en comparación al pescado crudo, siendo el salmón cocinado y marinado los que presentaron una menor extensión de la lipólisis y proteólisis en condiciones intestinales alteradas (pH 6 y concentración de sales biliares 1 mM). De lo contrario, en condiciones intestinales normales (pH 7 y concentración de sales biliares 10 mM), las muestras procesadas (marinado y cocinado) presentaron mayor digestibilidad que las de pescado crudo.

PALABRAS CLAVE: salmón, procesado, insuficiencia pancreática, digestión *in vitro*, lipólisis, proteólisis.

ABSTRACT

Pancreatic insufficiency is an alteration which is characterized by the inability of generate and tip out pancreatic enzymes in the duodenal part of the small intestine, thus causing maldigestion and macronutrient malabsorption, especially fats. Enzyme replacement therapy results in an oral intake of enzyme supplements and the dose is stablished based on the patient body weight. However, there are individual related factors (intestinal pH,

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD). Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

concentration of bile salts, concentration of enzymes, etc.), as well as food related factors (matrix structure, type of processing, composition, etc.) that could influence on fat and protein digestibility. In the present work, a static *in vitro* gastrointestinal digestion model has been used to assess the effect of salmon processing on the extent of lipolysis and proteolysis, analysing the influence of different intestinal conditions pH (6 and 7), enzyme concentration (0-6000 UL/g fat) and bile salts concentration (1 and 10 mM).

The results revealed that both the type of salmon processing and intestinal conditions influenced on macronutrients digestibility, specifically lipids. Both marinade and cooked affected the digestibility of lipids and proteins in comparison to raw fish, being the cooked and marinated salmon those that showed a smaller extent of lipolysis and proteolysis in altered intestinal conditions (pH 6 and concentration of bile salts 1 mM). Otherwise, under normal intestinal conditions (pH 7 and concentration of bile salts 10 mM), the processed samples (marinated and cooked) showed higher digestibility than those of raw fish.

KEY WORDS: salmon, processing, pancreatic insufficiency, *in vitro* digestion, lipolysis, proteolysis.

RESUM

La insuficiència pancreàtica és una afecció que es caracteritza per la incapacitat de generar i abocar enzims pancreàtics en la part duodenal de l'intestí prim, ocasionant maldigestió i malabsorció de macronutrients, especialment dels greixos. La teràpia de substitució enzimàtica consisteix en la ingesta oral de suplementos enzimàtics i la dosi es estableix en funció del pes corporal de l'individu. No obstant, existeixen altres factors propis de l'individu (pH intestinal, concentració de sals biliars, concentració d'enzims, etc.), així com propietats característiques de l'aliment (estructura matricial, tipus de processat, composició, etc.) que poden afectar la digestibilitat de greixos i proteïnes d'aquest. En el present treball s'ha utilitzat un model *in vitro* estàtic de digestió gastrointestinal per avaluar l'efecte del processat del salmó sobre l'extensió de la lipòlisi i proteòlisi, analitzant així mateix la influència de diferents condicions intestinals pH (6 i 7), concentració d'enzims (0-6000 UL/g greix) i concentració de sals biliars (1 i 10 mM).

Els resultats van revelar que tant el tipus de processament del salmó com les condicions intestinals van afectar a la digestibilitat de macronutrients i en major mesura als lípids. Tant el marinat com el cuinat van afectar la digestibilitat de lípids i proteïnes en comparació al peix cru, sent el salmó cuinat i marinat els que van presentar una menor extensió de la lipòlisi i proteòlisi en condicions intestinals alterades (pH 6 i concentració de sals biliars 1 mM). Altrament, en condicions intestinals normals (pH 7 i concentració de sals biliars 10 mM), les mostres processades (marinat i cuinat) van presentar major digestibilitat que les de peix cru.

PARAULES CLAU: salmó, processat, insuficiència pancreàtica, digestió *in vitro*, lipòlisi, proteòlisi.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha incrementado el consumo de pescado azul debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud. Dichos beneficios están atribuidos, principalmente, a la calidad y al tipo de nutrientes que estos presentan, ya que son una fuente principal de grasas y proteínas de alto valor biológico. Entre los diferentes productos de pesca, el salmón destaca por su alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados omega 3, especialmente el ácido eicosapentaenoico (20:5, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6, DHA). Los ácidos grasos poliinsaturados poseen propiedades beneficiosas para la salud, ya que actúan como protectores y reducen el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares e hipertensión entre otros (Valenzuela, 2005). El EPA en concreto, está relacionado con la protección de la salud cardiovascular, pues ejerce efectos hipotriglicéridémicos, hipocolesterolémicos y antiinflamatorios, mientras que el DHA es fundamental para el desarrollo y función del tejido nervioso y visual. Según la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) se recomienda el consumo de pescado entre tres y cuatro veces por semana. Es necesario introducir en la alimentación el aporte de ácidos grasos omega 3, dado que el organismo es incapaz de sintetizarlos por sí mismo. El consumo de dos o tres porciones semanales de salmón, ya es suficiente para abastecer el requerimiento mínimo de omega 3 (DHA y EPA) (Valenzuela, 2005). Asimismo, el salmón también destaca por su elevado contenido en proteínas de alto valor biológico (Fundación Española de la Nutrición); dichas proteínas se dividen principalmente en tres grupos: proteínas estructurales (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), proteínas sarcoplasmáticas (mioalbúmina, globulina y enzimas), y proteínas del tejido conectivo (colágeno) (FAO). No obstante, la digestibilidad de las proteínas y grasas de salmón podrían verse afectadas por el tipo de procesado previo a su consumo.

Si bien el salmón puede consumirse en crudo, habitualmente se somete a algún tipo de tratamiento, ya sea térmico (cocción, horneado, fritura, etc.) o no (ahumado, marinado, salado, etc.). Los diferentes métodos de cocinado con calor, dan como resultado productos de distintas características sensoriales y similares propiedades nutricionales (Gladyshev et al., 2006). Sin embargo, el ahumado y el marinado implican la penetración de sal, azúcar y algunas especias en la carne del salmón fresco, así como una importante pérdida de agua. Normalmente el marinado se realiza de forma artesanal, por lo que las condiciones del proceso pueden variar de unas regiones a otras. En España, tradicionalmente se efectúa con una mezcla de azúcar y sal, y el tiempo de marinado puede variar entre 5 y 72 horas (Larrazabal, 2005). El proceso de marinado afecta principalmente a las proteínas del músculo del pescado, disminuyendo la cantidad de agua en el músculo y por ende el peso del filete (Laub-Ekgreen et al., 2018).

Por otro lado, en los últimos años, debido a la globalización y a los diferentes movimientos migratorios, se ha incrementado la ingesta de pescado crudo (sushi, ceviche...etc.), ya que es una forma de consumo habitual en algunos países como Japón y Perú, por ejemplo. Surge por tanto la pregunta de cómo las distintas maneras de preparar el salmón pueden influir en la

digestibilidad de sus proteínas y grasas saludables, y por tanto en la calidad funcional de este alimento.

Actualmente, las técnicas de digestión in vitro son herramientas muy útiles, que permiten estudiar la influencia de factores como el procesado entre otros en la digestibilidad de sus macronutrientes, pudiendo además analizar la influencia de factores fisiológicos (composición de jugos digestivos, pH intestinal, pH gástrico...etc.). La digestión de los lípidos es la que está más comprometida cuando existen problemas de funcionamiento del páncreas exocrino, por ejemplo, y en esos casos los cambios composicionales y estructurales que implica el procesado pueden jugar un papel importante en la digestión (Asensio-Grau et al., 2018). Así pues, en enfermedades asociadas a la insuficiencia pancreática exocrina (IPE), como son la pancreatitis crónica (PC), la fibrosis quística (FQ) o el cáncer de páncreas el tipo de procesado de alimentos puede tener un papel relevante.

En el caso de la Fibrosis Quística, la IPE es causada por la obstrucción del conducto pancreático, lo que provoca una secreción insuficiente de jugos pancreáticos, en los que se encuentran los enzimas hidrolíticos. Asimismo, la obstrucción del conducto pancreático y biliar también provoca una disminución de bicarbonato de sodio y de sales biliares en la región intestino delgado, repercutiendo por tanto en el pH intestinal y en la concentración de sales biliares en el duodeno. Consecuentemente, se produce la maldigestión y malabsorción de nutrientes, principalmente lípidos y vitaminas liposolubles (A, D, E y K) (Maldonado Valderrama et al., 2011).

Así pues, los individuos que cursan con IPE requieren de una terapia de sustitución enzimática, que consiste en la administración oral de suplementos que contienen enzimas pancreáticos (lipasas, proteasas y amilasas), con el objetivo de mejorar los síntomas y su estado nutricional (López-Legarrea y Martínez, 2010). Hasta la fecha, la práctica clínica habitual establece la dosis de suplemento enzimático en base al peso del individuo. Sin embargo, este criterio resulta insuficiente para determinar la dosis óptima requerida, ya que los pacientes siguen presentando síntomas de malnutrición y esteatorrea.

En este contexto, se pone de relieve la influencia de otros factores que deben ser estudiados para establecer la dosis necesaria, por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar la influencia del método de procesado (crudo, marinado y cocinado), así como de las condiciones intestinales (pH intestinal, concentración de sales biliares y dosis de suplemento enzimático) en la digestibilidad de grasas y proteínas del salmón.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

El producto utilizado como muestra a digerir fue salmón totalmente limpio, sin cabeza, piel, ni espinas, y además de este, se utilizó sal, azúcar y film de cocina para la elaboración del marinado del salmón, todos ellos obtenidos en un supermercado local.

Para la realización de los fluidos digestivos, se emplearon los productos nombrados a continuación: pepsina obtenida de mucosa gástrica porcina (2500 U / g proteína), extracto de bilis bovina, KCl, KH₂PO₄, NaHCO₃, NaCl, MgCl₂(H₂O)₆, (NH₄)₂CO₃ y CaCl₂, todos ellos adquiridos en Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), y NaOH y HCl obtenidos en AppliChem Panreac.

Para llevar a cabo la digestión *in vitro* gastrointestinal, se empleó el suplemento enzimático comercial kreon® (Mylan, USA). Este se presenta en cápsulas en forma de esferas gastroresistentes, con 150 mg de pancreatina porcina cada una, equivalentes a: 10.000 unidades lipasa (UL), 800 unidades amilasa (UA) y 600 unidades proteasa (UP).

Para las determinaciones analíticas, se utilizaron los siguientes reactivos: Triton™ X-100, etanol 96%, ácido palmítico, éter de petróleo, ácido tricloroacético (TCA), todos ellos obtenidos de Sigma-Aldrich, además de EDTA y urea cristalina para análisis (ACS), adquiridos en AppliChem Panreac.

2.2. Preparación de la muestra

El salmón se compró y se limpió con el fin de eliminar la cabeza, la cola, la piel y las espinas, dejando tan solo los lomos de salmón totalmente limpios. Posteriormente, estos se dividieron en tres lotes, de los cuales, dos de ellos se procesaron de diferente manera para así obtener tres tipos de salmón con diferente procesado: salmón crudo, marinado y cocinado. El salmón crudo no sufrió ningún tipo de tratamiento. Para el marinado del salmón, se preparó una mezcla de sal y azúcar en proporción 1:1 (p/p) según Larrazábal-Fuentes et al., (2009), y se cubrió el salmón con dicha mezcla, se envolvió con film de cocina, y se mantuvo en nevera durante 9 horas. Pasado este tiempo, se lavó el salmón con agua y se secó con papel para eliminar el exceso de ésta. Por último, el salmón se cocinó por microondas (Samsung GW72N), a 450 W durante 4 minutos (2 minutos por cada cara), para una porción de 200 g de salmón. Tras los tratamientos, las muestras se sometieron a una digestión *in vitro* gastrointestinal.

2.3. Diseño experimental

La tabla 2.1 presenta las distintas condiciones intestinales estudiadas (pH intestinal, concentración de sales biliares y dosis de suplemento enzimático) para las diferentes muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado). El diseño experimental se dividió en dos sets de experimentos.

En primer lugar, se evaluó la influencia de la dosis de suplemento enzimático (2000, 4000 y 6000 UL/g grasa) en la digestibilidad de macronutrientes simulando las condiciones intestinales subóptimas, pH 6 y concentración de sales biliares 1 o 10 mM.

En segundo lugar, se estudió el efecto sobre la digestibilidad de macronutrientes en diferentes escenarios intestinales, pH 6 o 7 y concentración de sales biliares 1 o 10 mM, estableciendo una dosis fija de suplemento enzimático (2000 UL/g grasa). El pH intestinal de 7 y concentración de sales biliares 10 mM representa las condiciones intestinales óptimas que se dan en un adulto sano (Minekus et al., 2014). Mientras que el

pH intestinal de 6 y la concentración de sales biliares 1 mM representan las condiciones intestinales más desfavorables en personas con EPI (Gelfond et al., 2013).

TABLA 2.1. Diseño experimental de las condiciones experimentales de estudio.

Condiciones intestinales	pH	Concentración sales biliares (mM)	Dosis de suplemento enzimático (UL/ g grasa)
Subóptimas	6	1	2000, 4000, 6000
		10	2000, 4000, 6000
Óptimas	7	10	2000

2.4. Método estático de digestión *in vitro*

La digestión gastrointestinal, se llevó a cabo utilizando un modelo estático *in vitro* comprendido en tres etapas, la oral, la gástrica y la intestinal. Esta simulación se realizó en base al protocolo internacional INFOGEST Cost Action (Minekus et al., 2014), con algunas modificaciones en relación a las condiciones intestinales (Asensio-Grau et al., 2018).

Para llevar a cabo la digestión *in vitro*, se prepararon las disoluciones stock, cuyas composiciones pueden verse en tabla 2.2, y a partir de estas se simularon: el fluido salivar simulado (FSS), el fluido gástrico simulado (FGS), y el fluido intestinal simulado (FIS) y se realizó la digestión *in vitro* gastrointestinal con las proporciones que se muestran en la tabla 2.3.

TABLA 2.2. Composición detallada de las disoluciones Stock para un litro.

	SSS, pH 7 (mL)	SGS pH 3 (mL)	SIS pH 7 (mL)
KCl	30,2	13,8	13,6
KH ₂ PO ₄	7,4	1,8	1,6
NaHCO ₃	13,6	25	95
NaCl	-	23,6	18,3
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	1	0,8	2,2
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,12	1	-
Ajuste de pH			
NaOH (1N)	-	-	-
HCl (6N)	0,18	2,6	1,4
H ₂ O	947,5	931,4	867,9

SSS: Stock Salivar Simulado; SGS: Stock Gástrico Simulado; SIS: Stock Intestinal Simulado

TABLA 2.3. Ejemplo de un experimento de una digestión *in vitro* de salmón.

Etapa de la digestión	5 g de salmón			
	Oral (FSS)	Gástrica (FGS)	Intestinal (FIS)	
Alimento o digerido	5 g alimento	10 mL bolo alimenticio	20 mL quimo	
Disolución stock (SSS, SGS, SIS) (mL)	3,5	7,5	11	
CaCl ₂ (H ₂ O) (0,3 M) (mL)	0,025	0,005	0,04	
Enzimas	Amilasa salivar	Pepsina	Pancreatina encapsulada	Sales biliares
Actividad enzimática (U/mL) o concentración biliar (mM) en el total digerido (volumen final (mL) en cada etapa de la digestión).	75 U/mL	2.000 U/mL	30 UL/ mL 60 UL/ mL 90 UL/ mL	1 mM 10 mM
Volumen de solución enzimática/ solución de sales biliares añadida (mL)	0,5	2	5	2,5
Agua (mL)	0,975	0,295	1,31	
HCl (1 N) para ajustar el pH (mL)	-	0,2	-	
NaOH (1N) para ajustar el pH (mL)	-	-	0,15	
Volumen final (mL)	10	20	40	

*30 UL/mL, 60 UL/mL y 90 UL/mL equivale a 2000 UL/ g grasa, 4000 UL/ g grasa y 6000 UL/ g grasa respectivamente.

Una vez preparadas todas las disoluciones, y teniendo en cuenta las diferentes condiciones a estudiar (tabla 2.1), se procedió a realizar la simulación de la digestión.

Para llevar a cabo la digestión *in vitro* gastrointestinal se realizaron las siguientes etapas:

Etapa oral: La muestra se trituró con una batidora (Vario Mixer, Ufesa 600W), hasta alcanzar una textura similar a la que se obtendría en 20 ciclos de masticación, y se pesaron 5 g de muestra (aproximadamente 0,6 g de grasa) en tubos falcon de 50 mL. Posteriormente se añadió el FSS en proporción 1:1 (p/v), y se homogeneizó el bolo oral durante 1 minuto en el vortex (Heidolph, Reax top). A continuación, se dejaron reposar las muestras durante 1 minuto a 37°C, y se pasó a la etapa gástrica.

Etapa gástrica: Posteriormente, se añadió el FGS al bolo oral en proporción 1:1 (v/v), y con ayuda del pH-metro (SevenCompact™ S210, Mettler Toledo), se ajustó el pH a 3 mediante la adición de HCl 1N. Una vez ajustado el pH, las muestras se introdujeron en una cámara termostataada a 37°C (P-SELECTA, modelo Boxcult 3000957), y se dejaron en agitación a 55 rpm durante 2 horas (agitador Intelli-Mixer RM-2).

Etapa intestinal: Transcurrido el tiempo de la etapa gástrica, se introdujo el FIS al quimo gástrico en proporción 1:1 (v/v) a las condiciones correspondientes en cada caso, y se ajustó el pH a 6 ó 7, según correspondiese, con ayuda del pH-metro (SevenCompact™ S210, Mettler Toledo) y adicionando NaOH 1N. Tras esto, se volvieron a introducir las muestras en la cámara termostataada a 37°C (P-SELECTA, modelo Boxcult 3000957), y se tuvieron de nuevo en agitación a 55 rpm durante 2 horas

(agitador Intelli-Mixer RM-2). Una vez transcurrido este tiempo, se introdujeron las muestras en hielo durante 10 minutos para inactivar las enzimas.

2.5. Determinaciones analíticas

CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA: HUMEDAD, GRASA Y PROTEÍNA

Se determinó el contenido en humedad, grasa y proteína en las muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado) previamente a la digestión.

La determinación de humedad se realizó mediante un método gravimétrico, introduciendo el producto en estufa a 60°C durante 48 horas, y seguidamente otras 48 horas en estufa a vacío a 60°C hasta peso constante. Por otro lado, el contenido en grasa también se realizó por gravimetría en el que se realizó una extracción sólido-líquido (Soxhlet) con éter de petróleo (40:60). La determinación de proteínas se realizó mediante el método Kjeldahl. Los tres análisis se realizaron siguiendo los métodos oficiales de la AOAC (AOAC, 2000).

ÍNDICE DE DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ

La degradación de la matriz se realizó una vez terminada la digestión de acuerdo con Lamothe et al., (2014). El índice de degradación de la matriz (IDM) se calculó como la proporción de sólidos finalmente dispersados en el fluido después de la digestión. Tras digerir las muestras, estas se centrifugaron (Eppendorf, Centrifuge 5804 R) a 4000 g-force, durante 20 minutos y a 10°C. Posteriormente, la muestra se filtró con un tamiz (1,4 x 1,4 mm), separando así la fracción líquida de la parte sólida, la cual se utilizó para determinar la degradación de la matriz. Para ello, la fase sólida se colocó en recipientes de aluminio pesados previamente, y se dejaron en estufa a 60°C durante 48 horas, y a continuación en estufa a vacío a 60°C durante otras 48 horas, hasta alcanzar un peso constante. Pasado este tiempo, se volvieron a pesar, y se calculó el IDM mediante la aplicación de la siguiente ecuación (1):

$$IDM (\%) = \frac{CS_0 - CS_t}{CS_0} \cdot 100 \quad (1)$$

donde: CS_0 = contenido inicial de sólidos antes de la digestión; CS_t = contenido final de sólidos al finalizar la digestión.

DETERMINACIÓN DE LA LIPÓLISIS

La extensión de la lipólisis se evaluó a través de la determinación de ácidos grasos libres considerando la liberación de 2 ácidos grasos por cada triglicérido. Se tomaron alícuotas al final de la etapa intestinal, y se diluyeron en proporción (1:100 v/v) en una solución compuesta por: 5,6% de Triton X-100 y un 6% de etanol en agua bidestilada, para así solubilizar los ácidos grasos libres e inactivar la lipasa (Lamothe et al., 2012). Los ácidos grasos libres (AGL), se midieron mediante el uso de un kit enzimático (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Posteriormente, se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis), a una longitud de onda de 546 nm. El fundamento de esta determinación se basa en una serie de reacciones enzimáticas que desencadena en primer lugar la Coenzima A en presencia de ácidos grasos no esterificados, que junto con otros reactivos genera como resultado una coloración roja proporcional a la presencia de ácidos grasos libres en la muestra.

Para poder cuantificar los ácidos grasos libres, se utilizó una recta de calibrado, realizada con DHA como estándar (328,49 g/mol).

Una vez obtenidas las absorbancias, estas se compararon con las obtenidas previamente en la recta de calibrado con DHA, y se expresaron como mg de AGL por cada g grasa, teniendo en cuenta que, el DHA es el ácido graso mayoritario del salmón (Valenzuela, 2005) y su peso molecular es de 328,49 g/mol.

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÓLISIS

La proteólisis se determinó como proteína soluble en ácido tricloroacético (TCA) (Lamothe et al., 2014). Para ello, una vez terminada la digestión, se añadió TCA a cada muestra hasta obtener una concentración final del 12% (p/p), se homogenizaron en el vortex (Heidolph, Reax top), y se dejaron reposar durante 10 minutos. Pasado este tiempo, las muestras fueron centrifugadas (Eppendorf, MiniSpin plus) a 8000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente a la centrifugación, se diluyeron 50 μ L de sobrenadante en 1200 μ L de disolución tampón (50 mM EDTA y 8 M Urea, a pH 10), y se midió la absorbancia en espectrofotómetro (Thermo scientific, modelo Helios Zeta UV/Vis) a una longitud de onda de 280 nm.

Para poder cuantificar la proteína digerida, se realizó una recta de calibrado a partir de albúmina sérica bovina (BSA) y se expresaron los resultados como porcentaje de proteína soluble en TCA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para estudiar las posibles diferencias significativas entre las muestras, se realizaron análisis de la varianza unifactorial (ANOVA) para cada variable estudiada, con un nivel de confianza del 95 % ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Para ello, se utilizó el programa Statgraphics Centurión XVII. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización de las diferentes matrices antes de la digestión

La tabla 3.1 muestra la humedad, lípidos y proteínas en en gramos por cada gramo de muestra (salmón crudo, marinado y cocinado) en base

húmeda y en base seca (exenta de sal y azúcar en el caso del salmón marinado).

TABLA 3.1. Humedad, lípidos y proteína (g/g base húmeda (b.h.) y g/g base seca (b.s.) exenta de sal y azúcar en el salmón marinado) (media y desviación estándar) de cada una de las muestras de salmón evaluadas: crudo, marinado y cocinado.

Muestra	Humedad (g/ g b.h.)	Humedad (g/ g b.s.)	Lípidos (g/g b.h.)	Lípidos (g/g b.s.)	Proteína (g/g b.h.)	Proteína (g/g b.s.)
Salmón crudo	0,693±0,008 ^c	2,26±0,08 ^b	0,079±0,007 ^a	0,26±0,02 ^{ab}	0,218±0,004 ^b	0,71±0,02 ^b
Salmón marinado	0,558±0,013 ^a	1,649±0,107 ^a	0,12±0,02 ^b	0,36±0,08 ^b	0,208±0,004 ^a	0,614±0,013 ^a
Salmón cocinado	0,614±0,03 ^b	1,6±0,2 ^a	0,092±0,012 ^{ab}	0,23±0,03 ^a	0,248±0,005 ^c	0,65±0,05 ^{ab}

a-b: Superíndices diferentes señalan diferencias significativas entre las muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado) para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

Como se puede observar en la tabla 3.1, el contenido de agua, lípidos y proteína dependen del tipo de procesado del salmón. Tanto el tratamiento de cocinado por microondas como el proceso de marinado conllevaron una pérdida de agua, siendo el pescado marinado el que presentó una mayor deshidratación. Asimismo, se puede observar que el salmón marinado también presentó un menor contenido que proteína ya que durante el proceso de marinado se produce una deshidratación del músculo del pescado en la que las proteínas hidrosolubles, podrían haberse visto arrastradas junto con el agua (salmón marinado (0,614 g proteína/g sólido seco exento de sal y azúcar) < salmón cocinado (0,65 g proteína/ g sólido seco) < salmón crudo (0,71 g proteína/g sólido seco)). Por otro lado, el método de cocción también afectó en el contenido de proteína y lípidos del salmón. Durante la cocción se genera un exudado de agua y aceite, que podría haber arrastrado parte de las proteínas hidrosolubles presentes en el salmón lo que explica que el pescado cocinado presente una menor concentración de proteína que el pescado crudo. El salmón cocinado es el que presentó un menor contenido en lípidos debido a que durante el cocinado las altas temperaturas causan la fusión de la grasa del salmón en aceite que se exuda junto con el agua hacia el exterior.

3.2. Influencia del procesado y de las condiciones intestinales sobre la digestibilidad de los macronutrientes del salmón.

Las figuras 3.1, 3.2 y 3.3 muestran los resultados de los diferentes parámetros de digestibilidad: IDM (%), proteólisis y lipólisis, respectivamente, para las diferentes condiciones intestinales (pH 6 - concentración de sales biliares 1 mM, pH 6 - concentración de sales biliares 10 mM y pH 7 - concentración de sales biliares 10 mM) en las diferentes muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado). Tal y como se ve en la figura 3,1, el análisis estadístico puso de manifiesto la influencia del procesado y de las condiciones intestinales en la desestructuración de la matriz después de la digestión gastrointestinal.

Durante la digestión, se produce la desestructuración de la matriz por parte de los enzimas más relevantes que intervienen en el tracto gastrointestinal, la pepsina en la etapa gástrica y las lipasas, proteasas y amilasas pancreáticas en la etapa intestinal. Esta degradación facilita la liberación de los micro y macronutrientes del alimento al medio intestinal, por ello tiene gran importancia en alimentos con estructuras sólidas complejas, como es el caso del salmón. El parámetro de degradación de la matriz (IDM %) está estrechamente relacionado con los cambios fisicoquímicos que tienen lugar durante la digestión (Asensio-Grau et al., 2018). Las diferentes matrices de pescado tienen la misma composición de macronutrientes, pero diferente tratamiento y por tanto distinta estructura. Como resultado, las tres matrices de pescado pueden experimentar distintos cambios fisicoquímicos y por ello, diferente degradación. Asimismo, la eficiencia de los agentes enzimáticos en gran medida depende de las condiciones del medio intestinal (pH intestinal y concentración de sales biliares) influyendo en el resultado de las reacciones enzimáticas.

Como cabe esperar, las condiciones intestinales afectaron en la degradación de la matriz (figura 3.1), aumentando el valor de IDM% en condiciones óptimas de adulto sano (pH 7 y concentración de sales biliares 10 mM), a excepción del pescado cocinado. El pH óptimo para los enzimas pancreáticos (amilasas, lipasas y proteasas) se encuentra entre 7 y 9 (Li y Somerset, 2014), por tanto, el pH intestinal de 7 incrementa la actividad hidrolítica del enzima, dando como resultado una mejor digestibilidad de lípidos y proteínas, y una mayor degradación de la matriz.

En cuanto a la influencia del tratamiento del salmón, el salmón marinado y el crudo presentaron valores de degradación de la matriz próximos al 80% en condiciones intestinales óptimas (pH 7 y concentración biliar de 10 mM), mientras que el salmón cocinado presentó un IDM (%) próximo a 60. Durante el cocinado se produce la desnaturalización de las proteínas junto con una pérdida de agua, generando una matriz resultante más compacta y compleja, y, por tanto, más difícil de degradar (Asensio-Grau et al., 2018). En el caso del alto IDM (%) del salmón marinado, este resultado podría ser debido a la adición de sal, ya que esta produce un aumento de la fuerza iónica que altera la estructura del músculo, produciendo de este modo una matriz menos cohesionada (Astruc et al., 2008).

Aun siendo los pescados marinado y crudo los que presentaron una mayor degradación de la matriz en condiciones intestinales de concentración de sales biliares 10 mM, en el caso de concentración de sales biliares 1 mM, el pescado crudo obtuvo un menor IDM (%) respecto a los otros pescados (marinado y cocinado) (aproximadamente un 40%), por lo que se podría decir que la concentración adecuada de sales biliares junto con un pH intestinal óptimo, mejoran la degradación de la matriz en pescados crudos o marinados, pero no en aquellos que han sufrido un tratamiento de cocinado. Esto puede ser debido a que, durante el cocinado las proteínas sufren una elevada desnaturalización lo que reduce la degradación de la matriz, ya que se da la formación de enlaces covalentes entre las cadenas polipeptídicas, incrementando la unión entre proteínas mediante la formación de grupos lisinoalanina y de residuos de péptidos (Costa et al., 2015), lo que aumenta la

complejidad y compactación de la matriz. Sin embargo, en el caso del salmón marinado y crudo, la degradación es mayor, ya que la compactación de la matriz no es tan alta, en el caso del salmón marinado, aunque también sufre pérdida de agua y desnaturalización de proteínas por la alta concentración de sal, la matriz no se acompleja tanto, por lo que, según Maldonado Valderrama et al., (2011), las sales biliares se encargan de desplazar las proteínas de la red proteica que forma la matriz, degradándola. Por otro lado, la degradación de las tres matrices estudiadas presenta una mayor dependencia de la concentración de sales biliares que del pH intestinal.

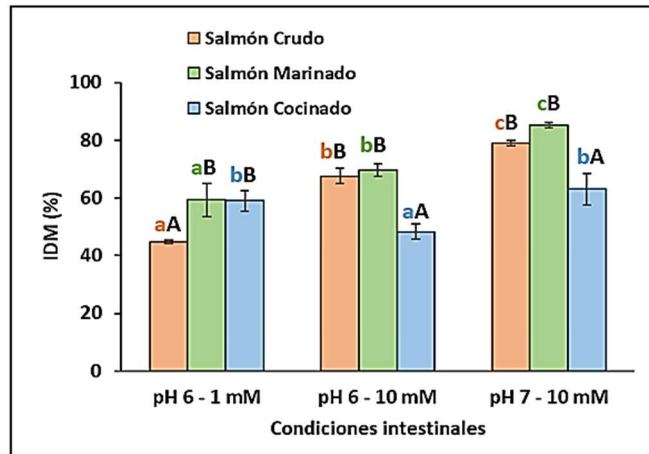


FIGURA 3.1. Índice de degradación de la matriz (%) del salmón crudo, salmón marinado y salmón cocinado después de la digestión para las diferentes condiciones intestinales (pH 6; concentración de sales biliares 1mM, pH 6; concentración de sales biliares 10 mM y pH 7; concentración sales biliares 10 mM), a una dosis de suplemento enzimático de 2000 UL/g grasa. a-c: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las diferentes condiciones intestinales para cada muestra de salmón (crudo, marinado y cocinado) para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). A-B: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado) para cada condición intestinal con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

El salmón posee una elevada cantidad de proteínas de alta calidad (10%-25%), y del mismo modo que los ácidos grasos poliinsaturados n-3, dichas proteínas son esenciales en la dieta ya que presentan propiedades antihipertensivas, anti-obesidad y estimulan la fibrinólisis (Cohen et al., 2005; Hosomi et al., 2012). En la figura 3.2 se observa la influencia de las condiciones intestinales y del tratamiento aplicado a las muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado), sobre la proteólisis expresada como porcentaje de proteína soluble en TCA. Como se puede observar, la proteólisis se ve poco afectada por las condiciones intestinales, salvo en el caso del pescado cocinado, cuya digestibilidad proteica es significativamente mayor en condiciones intestinales óptimas (pH 7 y concentración biliar 10 mM). La estructura más compacta del salmón cocinado, y por ende menos degradable, influye en la digestibilidad de las proteínas cuando las condiciones de pH intestinal y concentración de sales biliares no son las fisiológicamente normales. Como se ha visto anteriormente, bajo condiciones intestinales de pH7-10mM, se observó una mayor desestructuración de la matriz (figura 3.1), aumentando la digestibilidad de proteína ya que dicho pH se encuentra dentro

del rango óptimo de los enzimas pancreáticos (pH entre 7 y 9) (Li y Somerset, 2014).

De igual modo e independientemente del escenario intestinal, el tratamiento de las muestras afectó ligeramente en la digestibilidad de la proteína del salmón, aunque no significativamente. En cualquier caso, los valores de proteólisis en condiciones intestinales óptimas fueron próximos al 80%. En el caso de ambos escenarios intestinales subóptimos (pH intestinal de 6 – 1 mM y pH intestinal 6 – 10 mM) la proteína del pescado cocinado es la que se vio más comprometida, presentando valores ligeramente más bajos que los otros tipos de salmón. También se puede observar un ligero descenso en el salmón marinado en condiciones intestinales de pH 6 y concentración biliar 1 mM. La proteólisis del salmón cocinado y marinado se vio más afectada por las condiciones intestinales. En el caso del marinado, la adición de sales puede afectar a la estabilidad de las proteínas; según Arakawa y Tinasheff (1984), las sales a bajas concentraciones (0,2 g/mL agua) son capaces de estabilizar las proteínas mediante interacciones electrostáticas, mientras que a altas concentraciones (0,6 g/mL agua), dependiendo de la naturaleza de las proteínas, pueden estabilizarlas o desnaturalizarlas. En el marinado, la concentración de sal utilizada en el pescado resultó ser de 0,72 g/mL agua (alta concentración). Por ello, se podrían haber desnaturalizado parte de las proteínas, y por tanto, haber acomplejado la estructura de la matriz de un modo similar en el pescado cocinado.

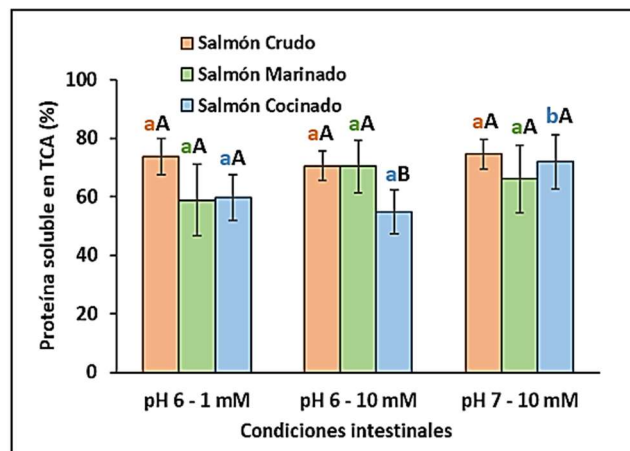


FIGURA 3.2. Proteólisis (porcentaje de proteína soluble en TCA) del salmón crudo, salmón marinado y salmón cocinado después de la digestión para las diferentes condiciones intestinales (pH 6; concentración de sales biliares 1 mM, pH 6; concentración de sales biliares 10 mM y pH 7; concentración sales biliares 10 mM), a una dosis de suplemento enzimático de 2000 UL/g grasa. a-c: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las diferentes condiciones intestinales para cada muestra de salmón (crudo, marinado y cocinado) para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). A-B: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado) para cada condición intestinal con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

Se denomina lipólisis al proceso de hidrólisis enzimática que sufren las grasas en su digestión, y que les permite ser absorbidas en el intestino delgado. En los alimentos, la grasa se presenta mayormente en forma de complejos formados por glicerol y tres ácidos grasos, llamados triglicéridos.

Estos forman micelas, sobre las cuales actúan las lipasas hidrolizando los enlaces éster, y liberando los ácidos grasos de uno en uno (Griffiths, 2014; Vanbergen, 2013). En la figura 3.3, se muestra la influencia de las condiciones intestinales y del tratamiento aplicado a cada muestra de salmón, sobre la extensión de la lipólisis (mg AGL/g grasa). En estructuras proteicas complejas, las moléculas de grasa se encuentran atrapadas en la matriz proteica del alimento comprometiendo la digestibilidad de grasas con la hidrólisis de la proteína, ya que, al descomponerse la estructura proteica, se liberan los lípidos de la matriz, facilitando la emulsificación y la acción de las lipasas (Asensio-Grau et al., 2019). Se puede observar una influencia significativa de las condiciones intestinales sobre la digestibilidad de los lípidos. Esta está muy comprometida no sólo por la estructura del alimento, sino también por las condiciones de pH intestinal y concentración de sales biliares. Como se ha indicado anteriormente, el pH óptimo de los enzimas pancreáticos se encuentra entre 7 y 9 (Li y Somerset, 2014), en concreto el de la lipasa está comprendido entre 7-8 (Calvo-Lerma et al., 2019). Además, en la lipólisis el papel de las sales biliares es crucial, ya que se encargan de emulsionar la grasa, aumentando la superficie específica de las micelas, facilitando el acceso a las lipasas y mejorando la bioaccesibilidad de los lípidos (Maldonado-Valderrama et al., 2011), y también presentan un efecto activador de la lipasa pancreática (Kimura et al., 1982).

En relación con la influencia del tratamiento de las diferentes muestras de salmón, en la figura 3.3, se observan diferentes tendencias en función de la condición intestinal. Por un lado, el salmón crudo parece alcanzar el mayor valor de lipólisis (aproximadamente 100 mg AGL/ g grasa) en condiciones intestinales subóptimas (pH 6 y concentración biliar 1 mM). Sin embargo, dicho incremento no es muy acusado por lo que no es posible atribuir ningún efecto del tratamiento del pescado en dichas condiciones. En el caso de las condiciones intestinales de pH 6 y concentración biliar de 10 mM, sí parece observarse un aumento en la lipólisis del salmón cocinado por lo que el método de cocinado podría aumentar la digestibilidad de grasas de salmón (aproximadamente 200 mg AGL/ g grasa). En condiciones intestinales óptimas (pH 7 y concentración de sales biliares 10 mM), se observa que el pescado marinado y cocinado alcanzaron los mayores valores de lipólisis (aproximadamente 500 mg AGL/ g grasa) mejorando notablemente su digestibilidad. Esto es debido a que, tanto en el proceso de marinado como cocinado alteran la estructura del salmón facilitando la liberación de la grasa matricial y por tanto su digestibilidad. Además, en el caso del salmón crudo la proporción de grasa por gramo de proteína es de 0,35. Los tratamientos afectaron a este ratio (grasa:proteína) resultando en 0,56 y 0,38 el salmón marinado y cocinado respectivamente. Actualmente, hay escasa literatura que confirme el efecto de la cantidad de grasa respecto a la de proteína en la digestibilidad de ambos macronutrientes, pero según Calvo-Lerma et al., (2018) y conforme con los resultados obtenidos, si existen pequeños indicios que muestran que al aumentar el ratio grasa:proteína, y por ello la cantidad de grasa del salmón respecto a la de proteína, se incrementa la digestibilidad de los lípidos del mismo.

Respecto a las condiciones intestinales, y como se puede observar en la figura 3.3, el incremento de pH intestinal y de sales biliares, mejoraron la eficiencia de la lipólisis en todas las muestras de salmón, siendo esa mejora más acusada en el salmón cocinado y marinado. Como se ha indicado anteriormente, durante el cocinado se produce la desnaturalización de las proteínas (Asensio-Grau et al., 2018) y la liberación del aceite de pescado hacia el exterior, y ya que según Gonzalez-Bacerio et al., (2010), se ha observado inhibición de lipasas por exceso de sustrato o producto, esto podría explicar la menor digestibilidad de grasas en salmón cocinado a condiciones subóptimas (pH 6 y concentración de sales biliares 1 mM), ya que durante la lipólisis, puede haberse producido una gran cantidad de AGL, y al presentarse una concentración de sales biliares baja (1 mM), estas no son capaces de retirar los productos resultantes, generándose dicha inhibición. Por otro lado, en el salmón marinado, se produce la solubilización de las proteínas estructurales (solubles en soluciones salinas de alta fuerza iónica, $\geq 0,5$ M) y sarcoplasmáticas (solubles en soluciones salinas de baja fuerza iónica, 0,15 M) causada por la penetración de sal en los tejidos (FAO; Martínez et al., 2012), consecuentemente se produce la alteración de la estructura del músculo que da como resultado una matriz de estructura más débil (Astruc et al., 2008), en la que se liberan con mayor facilidad las grasas favoreciendo la emulsificación de las mismas por efecto de las sales biliares.

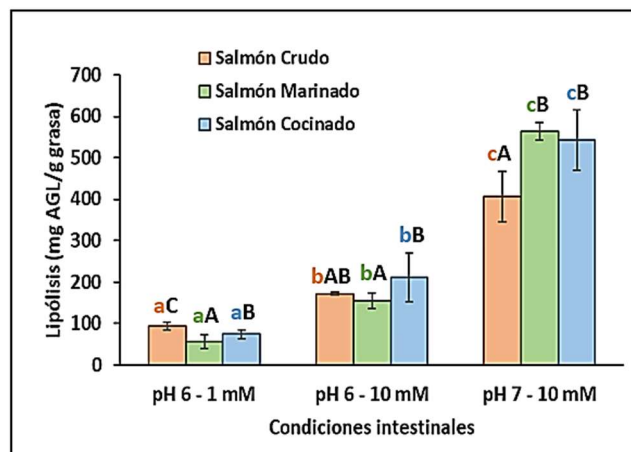


FIGURA 3.3. Lipólisis (mg AGL/ g grasa) del salmón crudo, salmón marinado y salmón cocinado después de la digestión para las diferentes condiciones intestinales (pH 6; concentración de sales biliares 1mM, pH 6; concentración de sales biliares 10 mM y pH 7; concentración sales biliares 10 mM), a una dosis de suplemento enzimático de 2000 UL/g grasa. a-c: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las diferentes condiciones intestinales para cada muestra de salmón (crudo, marinado y cocinado) para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$). A-B: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado) para cada condición intestinal con un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

3.3. Influencia de la dosis de suplemento enzimático sobre la digestibilidad de los macronutrientes del salmón.

Como se ha visto en el apartado anterior, las condiciones intestinales son relevantes para una óptima digestibilidad de los macronutrientes del salmón,

en concreto de las grasas. Las condiciones intestinales propias de la insuficiencia pancreática se caracterizan por tener un pH intestinal ligeramente más ácido (pH 6) y en algunos casos, una concentración de sales biliares por debajo de 10 mM. En este sentido, cabe resaltar la importancia de estudiar la influencia de la dosis de suplemento enzimático en ambos escenarios intestinales. Las figuras 3.4, 3.5 y 3.6 muestran los resultados de los diferentes parámetros de digestibilidad: IDM (%), proteólisis y lipólisis, respectivamente, en las diferentes dosis de suplemento enzimático (0, 2000, 4000 y 6000 UL/ g grasa) en dos escenarios intestinales desfavorables, para las diferentes muestras de salmón (crudo, marinado y cocinado). Como muestra la figura 3.4, la dosis de suplemento enzimático no parece tener un efecto significativo en la degradación de la matriz del alimento, independientemente del escenario intestinal. Si se observa que en ambos escenarios intestinales (pH 6 – 1 mM y pH 6 – 10 mM), la máxima degradación de la matriz para todas las muestras de salmón, se alcanza para una dosis de suplemento enzimático de 2000 UL/g grasa. Esta máxima degradación se corresponde con aproximadamente un 40% y un 65% para el salmón crudo, un 60% y un 65% para el salmón marinado, y un 60% y un 40% para el salmón cocinado (en condiciones de pH 6-1mM y pH6-10 mM respectivamente). Por lo que el aumento de dosis no conlleva una mejora significativa en la degradación de la matriz.

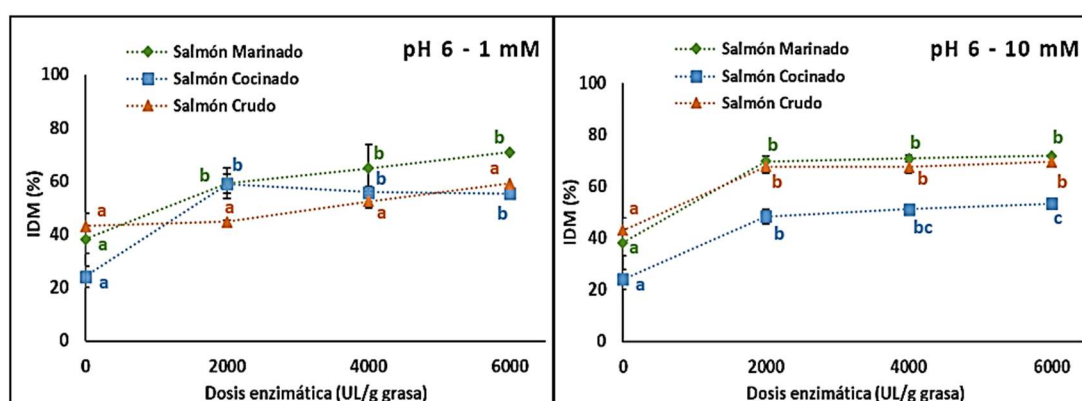


FIGURA 3.4. Índice de degradación de la matriz (%) del salmón crudo, salmón marinado y salmón cocinado después de la digestión para las diferentes dosis de suplemento enzimático (0, 2000, 4000 y 6000 UL/ g grasa) en dos condiciones intestinales desfavorables (pH 6; concentración de sales biliares 1mM y pH 6; concentración de sales biliares 10). a-c: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las diferentes dosis para cada muestra de salmón (crudo, marinado y cocinado) para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

La digestión de las proteínas empieza en el estómago, y es la pepsina la responsable de iniciar este proceso de hidrólisis. Tras esto, la digestión continúa en el intestino delgado gracias a los enzimas pancreáticos como: tripsina, quimiotripsina, aminopeptidasas y carboxipeptidasas. Aquí, gran parte de los péptidos de más de tres aminoácidos, se hidrolizan (sobre un 25% de la proteína de la dieta se absorbe como dipéptidos y tripéptidos) (Sanz, 2006).

Como se ve en la figura 3.5, la digestibilidad de la proteína no aumentó con la dosis de pancreatina, independientemente del escenario intestinal y del tipo

de procesado del salmón (crudo, marinado y cocinado). Como era de esperar, la determinación del IDM (%) y la proteólisis siguieron una tendencia similar, alcanzando el máximo valor de proteólisis y de IDM (%) con una dosis de suplemento enzimático de 2000 UL/ g grasa. Dichos valores máximos se corresponden con aproximadamente un 70% en ambos escenarios para el salmón crudo, un 50% en ambos escenarios para el salmón cocinado, y un 50% y un 70% para el salmón marinado, a pH 6-1 mM y pH 6-10 mM respectivamente.

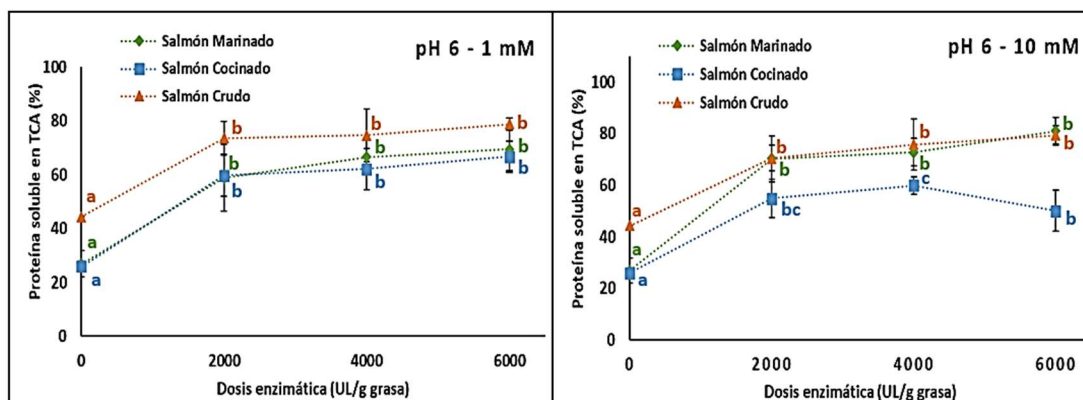


FIGURA 3.5. Proteólisis (porcentaje de proteína soluble en TCA) del salmón crudo, salmón marinado y salmón cocinado después de la digestión para las diferentes dosis de suplemento enzimático (0, 2000, 4000 y 6000 UL/ g grasa) en dos condiciones intestinales desfavorables (pH 6; concentración de sales biliares 1mM y pH 6; concentración de sales biliares 10). a-c: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las diferentes dosis para cada muestra de salmón (crudo, marinado y cocinado) para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

Como muestra la figura 3.6, la lipólisis del pescado crudo y del marinado aumentó conforme a la dosis de suplemento enzimático hasta alcanzar la máxima digestibilidad (200 y 250 mg AGL/ g grasa, respectivamente) con la máxima dosis de suplemento (6000 UL/ g grasa) en condiciones intestinales de pH 6 y concentración de sales biliares de 1 mM. Por otro lado, en este mismo escenario intestinal, el pescado cocinado alcanzó un valor máximo de lipólisis (182 mg AGL/ g grasa) con una dosis de suplemento enzimático de 4000 UL/ g grasa. De la misma manera, la lipólisis de los tres pescados siguió una tendencia similar en condiciones intestinales de pH 6 y concentración de sales biliares 10 mM. No obstante, la dosis necesaria para alcanzar la máxima lipólisis fue menor que en el caso de tener una menor concentración de sales biliares, debido a la emulsificación de las grasas producida por la acción emulsificante de las sales biliares, lo que facilita el acceso de las lipasas y la hidrólisis de lípidos (Maldonado-Valderrama et al., 2011). El salmón crudo y el marinado obtuvieron valores máximos de lipólisis (160 y 165 mg AGL/ g grasa respectivamente) con una dosis de suplemento enzimático de 4000 UL/ g grasa, mientras que el salmón cocinado alcanzó una extensión de la lipólisis de 200 AGL/ g grasa, con una dosis de suplemento enzimático de 2000 UL/ g grasa.

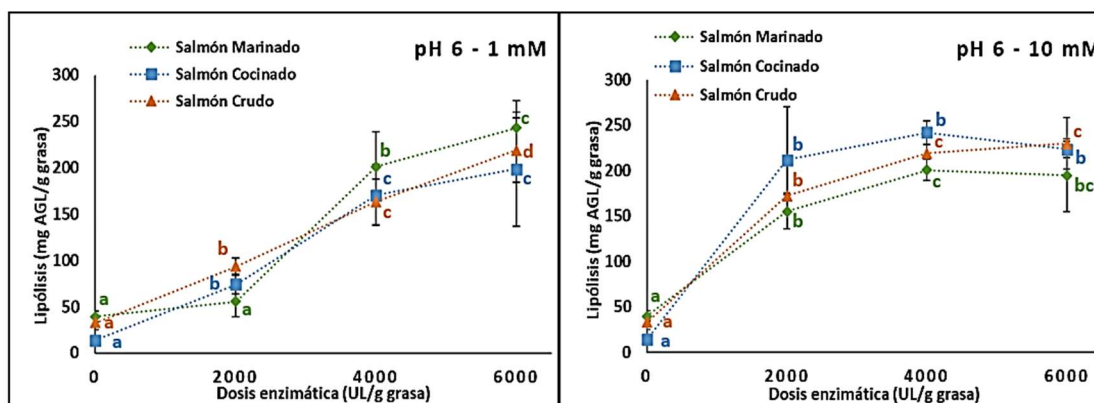


FIGURA 3.6. Lipólisis (mg AGL/ g proteína) del salmón crudo, salmón marinado y salmón cocinado después de la digestión para las diferentes dosis de suplemento enzimático (0, 2000, 4000 y 6000 UL/ g grasa) en dos condiciones intestinales desfavorables (pH 6; concentración de sales biliares 1mM y pH 6; concentración de sales biliares 10). a-c: Letras diferentes señalan diferencias significativas entre las diferentes dosis para cada muestra de salmón (crudo, marinado y cocinado) para un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$).

4. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó la influencia de 2 tipos de procesado de salmón en la digestibilidad de grasas y proteína bajo distintos escenarios de condiciones intestinales de pH, concentración de sales biliares y concentración de enzimas. Los resultados obtenidos muestran que tanto el tipo de procesado como las condiciones intestinales del individuo, afectan significativamente a la digestibilidad de los macronutrientes del salmón.

Tanto el marinado como el cocinado afectaron a la digestibilidad de lípidos y proteínas en comparación al pescado crudo, siendo el salmón cocinado y marinado los que presentaron una menor extensión de la lipólisis y proteólisis en condiciones intestinales alteradas (pH 6 y concentración de sales biliares 1 mM). De lo contrario, en condiciones intestinales normales (pH 7 y concentración de sales biliares 10 mM), las muestras procesadas (marinado y cocinado) presentaron mayor digestibilidad que las de pescado crudo.

Respecto a la influencia de las condiciones intestinales, tan sólo afectaron a la proteólisis del salmón cocinado obteniéndose mayor digestibilidad bajo condiciones intestinales normales de pH 7 y concentración de sales biliares 10 mM. Sin embargo, la digestibilidad de lípidos se vio muy comprometida por las condiciones intestinales en todos los casos, obteniendo una mayor digestibilidad con el aumento de pH y concentración de sales biliares.

La dosis de suplemento enzimático afectó tan solo en la digestión de lípidos del salmón. La digestibilidad lipídica aumentó conforme a la dosis de suplemento enzimático, alcanzando valores máximos de lipólisis con la máxima dosis de enzima en condiciones de pH intestinal y concentración de sales biliares desfavorables, para el salmón crudo y marinado. Mientras que en condiciones de pH intestinal de 6 y concentración óptima de sales biliares (10 mM), se alcanzó la máxima extensión de la lipólisis con una dosis menor de suplemento enzimático.

5. REFERENCIAS

- AOAC, 2000. Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition.
- Arakawa, T.; Timasheff, S. N. 1984. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, **23(25)**:5912-5923.
- Asensio-Grau, A.; Peinado, I.; Heredia, A.; Andrés, A. 2018. Effect of cooking methods and intestinal conditions on lipolysis, proteolysis and xanthophylls bioaccessibility of eggs. *Journal of functional foods*, **46**:579-586.
- Asensio-Grau, A.; Calvo-Lerma, J.; Heredia, A.; Andrés, A. 2019. Fat digestibility in meat products: influence of food structure and gastrointestinal conditions. *International journal of food sciences and nutrition*, **70(5)**:530-539.
- Astruc, T.; Labas, P.; Vendevre, J. L.; Martin, J. L.; Taylor, R. G. 2008. Beef usage structure affected by sodium chloride and potassium lactate. *Meat science*, **80(4)**:1092-1099.
- Calvo-Lerma, J.; Formés-Ferrer, V.; Heredia, A.; Andrés, A. 2018. In Vitro Digestion of Lipids in Real Foods: Influence of Lipid Organization Within the Food Matrix and Interactions with Nonlipid Components. *Journal of food science*, **83(10)**: 2629-2637.
- Calvo-Lerma, J.; Fornés-Ferrer, V.; Heredia, A.; Andrés, A. 2019. In vitro digestion models to assess lipolysis: The impact of the simulated conditions for gastrointestinal pH, bile salts and digestion fluids. *Food Research International*, 108511.
- Cohen, J.; Bellinger, D.; Connor, W.; Krisetherton, P.; Lawrence, R.; Savitz, D.; Shaywitz, B.; Teutsch, S.; Gray, G. 2005. A quantitative risk-benefit analysis of changes in population fish consumption. *American journal of preventive medicine*, **29(4)**: 325-334.
- Costa, S.; Afonso, C.; Cardoso, C.; Batista, I.; Chaveiro, N.; Nunes, M. L.; Bandarra, N. M. 2015. Fatty acids, mercury, and methylmercury bioaccessibility in salmon (*Salmo salar*) using an in vitro model: Effect of culinary treatment. *Food chemistry*, **185**:268-276.
- Gelfond, D.; Ma, C.; Semler, J.; Borowitz, D. 2013. Intestinal pH and gastrointestinal transit profiles in cystic fibrosis patients measured by wireless motility capsule. *Digestive diseases and sciences*, **58(8)**:2275-2281.
- Gladyshev, M. I.; Sushchik, N. N.; Gubanenko, G. A.; Demirchieva, S. M.; Kalachova, G. S. 2006. Effect of way of cooking on content of essential polyunsaturated fatty acids in muscle tissue of humpback salmon (*Oncorhynchus gorbusha*). *Food Chemistry*, **96(3)**:446-451.
- González-Bacerio, J.; Hernández, J. R.; del Monte Martínez, A. 2010. Las lipasas: enzimas con potencial para el desarrollo de biocatalizadores inmovilizados por adsorción interfacial. *Revista Colombiana de Biotecnología*, **12(1)**:124-140.
- Griffiths, M. 2014. Lo esencial en aparato digestivo. Elsevier. 4^a edición.
- Hosomi, R.; Yoshida, M.; Fukunaga, K. 2012. Seafood consumption and components for health. *Global journal of health science*, **4(3)**: 72.
- Kimura, H.; Furami, Y.; TARUI, S. I.; SHINOMIYA, T. 1982. Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bile salts. *The Journal of Biochemistry*, **92(1)**:243-51.
- Lamothe, S.; Corbeil, M. M.; Turgeon, S. L.; Britten, M. 2012. Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food & function*, **3(7)**:724-731.
- Lamothe, S.; Azimy, N.; Bazinet, L.; Couillard, C.; Britten, M. 2014. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. *Food & function*, **5(10)**:2621-2631
- Larrazábal-Fuentes, M. J. 2005. Estudio de la aplicación de técnicas de marinado de salmón (*salmo salar*) alternativas al proceso tradicional. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Larrazábal-Fuentes, M.J.; Escriche-Roberto, I.; Camacho-Vidal, M.D.M. 2009. Use of immersion and vacuum impregnation in marinated salmon (*Salmo salar*) production. *Journal of food processing and preservation*, **33(5)**:635-650.
- Laub-Ekgreen, M. H.; Martinez-Lopez, B.; Frosch, S.; Jessen, F. 2018. The influence of processing conditions on the weight change of single herring (*Clupea herengus*) fillets during marinating. *Food research international*, **108**:331-338.
- Li, L.; Somerset, S. 2014. Digestive system dysfunction in cystic fibrosis: challenges for nutrition therapy. *Digestive and liver disease*, **46(10)**:865-874.

- López-Legarrea, P.; Martínez, J.A. 2010. Nutrition in the cystic fibrosis patient. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*, **30(2)**:13-19.
- Maldonado-Valderrama, J.; Wilde, P.; Macierzanka, A.; Mackie, A. 2011. The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, **165(1)**:36-46.
- Martínez, O.; Salmerón, J.; Guillén, M. D.; Pin, C.; Casas, C. 2012. Physicochemical, sensorial and textural characteristics of liquid-smoked salmon (*Salmo salar*) as affected by salting treatment and sugar addition. *International journal of food science & technology*, **47(5)**:1086-1096.
- Minekus, M.; Alminger, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T. O. R. S. T. E. N.; Bourlieu, C.; ... Dufour, C. 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, **5(6)**: 1113-1124.
- Sanz, M. 2006. Proteínas en nutrición artificial. Abbott.
- Valenzuela B, A. "Salmon: A health banquet", [en línea]. *Revista chilena de nutrición*. Vol 32 No.1 (2005) Dirección URL: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182005000100001&lng=en&nrm=iso>. [Consulta: 15 de May. 2019].
- Vanbergen, A. 2013. Lo esencial en metabolismo y nutrición. Elsevier.4ª edición.