

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



**PRODUCCIÓN EN REACTORES DE MEMBRANA
DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE
PROTEÍNAS LÁCTEAS PARA NUTRICIÓN ENTERAL**

TESIS DOCTORAL

Antonio María Guadix Escobar

2001



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

18071 GRANADA

PRODUCCIÓN EN REACTORES DE MEMBRANA DE HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE PROTEÍNAS LÁCTEAS PARA NUTRICION ENTERAL

Memoria que presenta el Licenciado en Ciencias Químicas e Ingeniero Químico Antonio María Guadix Escobar para aspirar al Grado de Doctor Ingeniero Químico.

Granada, 17 de enero de 2001

*Antonio
Guadix*

Fdo: Antonio María Guadix Escobar

ENCARNACIÓN JURADO ALAMEDA, Catedrática de Ingeniería Química y Directora del Departamento del mismo nombre,

CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Producción en reactores de membrana de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral" ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección del Dr. D. Fernando Camacho Rubio, Dra. D^a Emilia María Guadix Escobar y del Dr. D. Vicente Bravo Rodríguez por el Licenciado en Ciencias Químicas e Ingeniero Químico Antonio María Guadix Escobar para aspirar al grado de Doctor Ingeniero Químico.



[Signature]
Fdo: Encarnación Jurado Alameda

Los Directores de la Tesis

[Signature]

Fdo: Fernando Camacho Rubio
Catedrático de Ingeniería Química

[Signature]

Fdo: Emilia M. Guadix Escobar
Profesora Titular de Ingeniería Química

[Signature]

Fdo: Vicente Bravo Rodríguez
Catedrático de Ingeniería Química

El autor expresa su agradecimiento:

- A los doctores Fernando Camacho, Emilia M^a Guadix y Vicente Bravo por su dirección.
- A la Junta de Andalucía por la concesión de una Beca de Formación de Personal Docente e Investigador.
- Al doctor Munir Cheryan y a los miembros de Agricultural Bioprocess Laboratory por su ayuda durante la estancia en University of Illinois at Urbana-Champaign.
- A Puleva Biotech S.A. por facilitar los medios para la realización de algunos experimentos.
- A la doctora Olga Martínez del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada por su colaboración en algunas medidas analíticas.
- A los miembros del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada por su ayuda desinteresada.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	11
1. RESUMEN	16
2. INTRODUCCIÓN	23
2.1. Hidrolizados de proteínas.	24
2.1.1. Química de la rotura del enlace peptídico.	24
2.1.2. Propiedades funcionales y nutricionales de los hidrolizados.	28
2.1.3. Sustratos.	31
2.1.4. Proteasas.	34
2.1.5. Estudios del proceso.	36
2.1.6. Estudios cinéticos.	40
2.2. Producción de hidrolizados.	46
2.2.1. Reactores para hidrólisis de proteínas.	47
2.2.2. Procesos patentados.	61
3. OBJETIVOS	67
4. MATERIALES Y MÉTODOS	70
4.1. Sustrato.	71
4.2. Proteasas.	72
4.2.1. Alcalase [®] 0.6 L.	72
4.2.2. Multifect [®] P-3000	73
4.2.3. Protex [®] 6 L	73
4.2.4. PEM [®] 2500 S	73
4.3. Métodos.	74
4.3.1. Determinación del contenido en proteína.	74
4.3.2. Determinación del nitrógeno soluble.	75

4.3.3. Composición en aminoácidos.	75
4.3.4. Selección de la enzima.	77
4.3.5. Determinación del grado de hidrólisis.	78
4.3.6. Determinación del peso molecular medio.	80
4.3.7. Distribución de pesos moleculares.	80
4.3.8. Determinación de la actividad enzimática.	82
4.3.9. Secado por atomización.	82
4.3.10. Determinación del potencial antigénico.	83
4.4. Reactor discontinuo.	85
4.5. Reactor de membrana.	86
4.5.1. Unidad de reacción y módulo de separación.	86
4.5.2. Limpieza del módulo de membrana.	88
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
5.1. Determinación del peso molecular medio y moles de enlaces del sustrato.	90
5.2. Selección de la enzima.	93
5.3. Cálculo del grado de hidrólisis.	94
5.3.1. Aspectos teóricos.	94
5.3.2. Cálculo experimental del pK medio para el sistema WPC-Protex 6L.	106
5.3.3. Grado de hidrólisis por consumo de base.	110
5.3.4. Grado de hidrólisis por descenso crioscópico.	110
5.4. Relación del grado de hidrólisis con otros parámetros.	112
5.4.1. Nitrógeno soluble.	112
5.4.2. Peso molecular medio de los péptidos.	113
5.4.3. Distribución de pesos moleculares.	117
5.5. Desactivación de la enzima.	118
5.6. Cinética de la hidrólisis.	122
5.7. Reactor discontinuo.	132

5.8. Caracterización del módulo de membrana.	137
5.9. Reactor de membrana.	147
5.9.1. Experimento 1: $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$ y $V = 2$ L.	148
5.9.2. Experimento 2: $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$ y $V = 2$ L.	152
5.9.3. Experimento 3: $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$ y $V = 2$ L.	155
5.9.4. Experimento 4: $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$ y $V = 2$ L.	158
5.9.5. Experimento 5: $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$ y $V = 1.5$ L.	161
5.10. Caracterización del producto.	168
6. CONCLUSIONES	171
7. NOMENCLATURA	175
8. BIBLIOGRAFÍA	180
9. APÉNDICES	192
Apéndice 9.1.	193
Apéndice 9.2.	196
Apéndice 9.3.	201
Apéndice 9.4.	222
Apéndice 9.5.	229
Apéndice 9.6.	232
Apéndice 9.7.	233

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las especies producidas en la hidrólisis de proteínas.	25
Tabla 2 Valores de pK para varios aminoácidos y péptidos a 25 °C. (Voet y Voet, 1990)	27
Tabla 3. Péptidos opioides.	30
Tabla 4. Calidad proteica de algunas proteínas alimentarias.	32
Tabla 5. Distribución de proteínas de la leche.	33
Tabla 6. Distribución de aminoácidos en la leche.	34
Tabla 7. Proteasas comerciales.	36
Tabla 8. Análisis del concentrado de proteínas del lactosuero.	71
Tabla 9. Gradiente óptimo para el análisis de feniltiocarbamil derivados por HPLC.	77
Tabla 10. Condiciones óptimas para las enzimas preseleccionadas.	78
Tabla 11. Pesos moleculares y tiempos de retención de los patrones utilizados.	81
Tabla 12. Integración del cromatograma del sustrato.	91
Tabla 13. Aminograma del sustrato.	92
Tabla 14. Rango de pH usado para calcular los valores de pK mediante las ecuaciones [5.19] y [5.28].	99
Tabla 15. pK frente a pH: parámetros de regresión lineal para $\mu = 7.0$. Resultados del ajuste en el rango lineal.	100
Tabla 16. Valores de CF.	109
Tabla 17. Valores de descenso crioscópico y grado de hidrólisis.	111
Tabla 18. Descenso crioscópico experimental y calculado por la ecuación [5.26].	111
Tabla 19. Correspondencia entre grado de hidrólisis y nitrógeno soluble.	112
Tabla 20. Peso molecular de los péptido a través del grado de hidrólisis y del descenso crioscópico.	116
Tabla 21. Distribución de pesos moleculares con el grado de hidrólisis.	117
Tabla 22. Desactivación de la enzima en presencia de sustrato.	119
Tabla 23. Desactivación de la enzima en ausencia de sustrato.	120
Tabla 24. Desactivación de la enzima ocasionada por el bombeo.	120

Tabla 25. Desactivación de la enzima ocasionada por la membrana.	120
Tabla 26. Experimentos realizados con el sistema WPC-Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C.	122
Tabla 27. Enlaces susceptibles de ser hidrolizados por Protex 6L en proteínas del lactosuero.	127
Tabla 28. Grado de hidrólisis y factor de accesibilidad.	128
Tabla 29. Conversión a nitrógeno soluble y grado de hidrólisis en un reactor discontinuo para el sistema WPC-Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C	133
Tabla 30 Caudal de retenido y presiones con agua desionizada a 50 °C	138
Tabla 31 Caudal de retenido y presiones para un hidrolizado de WPC al 10 % y 50 °C.	138
Tabla 32. Caudales de filtrado y presiones para agua desionizada	141
Tabla 33. Caudales de filtrado y presiones para hidrolizado.	142
Tabla 34. Contenido en nitrógeno en el filtrado durante la ultrafiltración a recirculación total para un hidrolizado al 10 %.	146
Tabla 35. Variables ensayadas en el reactor de membrana.	147
Tabla 36. Experimentos realizados en el reactor de membrana.	148
Tabla 37 Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$ y $V = 2$ L.	149
Tabla 38. Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$ y $V = 2$ L	152
Tabla 39. Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$ y $V = 2$ L.	155
Tabla 40. Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$ y $V = 2$ L.	158
Tabla 41 Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$ y $V = 1.5$ L.	161
Tabla 42. Resultados obtenidos en el reactor de membrana.	164

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reparto de las diferentes especies iónicas de un polipéptido en función del pH	26
Figura 2. Dispositivo experimental para hidrólisis en discontinuo y valoración de proteína.	79
Figura 3. Curva de calibrado de la distribución de pesos moleculares.	81
Figura 4. Secadero por atomización. (1) Alimentación, (2) Entrada de aire de secado, (3) Atomizador, (4) Aire a presión, (5) Calefacción del aire de secado, (6) Cámara de secado, (7) Ciclón, (8) Recogida del producto, (9) Ventilador de aspiración.	83
Figura 5. Reactor de membrana para la hidrólisis continua de proteínas.	86
Figura 6. Cromatograma del sustrato al 1 %, pH = 8.5 y T = 50 °C	90
Figura 7. Hidrólisis de proteínas del lactosuero con diferentes enzimas comerciales. $s_0 = 50$ g/L, E/S = 0.01, T = 50 °C, pH _{bacterianas} = 8.5, pH _{animal} = 8.0	93
Figura 8. Diagrama de Richardson de Protex 6L.	94
Figura 9. Variación del pK con el pH determinado mediante las ecuaciones [5.19] y [5.28] para $\mu=7.0$ y $\sigma=0.5$.	98
Figura 10. Variación del pK con el pH determinado mediante las ecuaciones [5.19] y [5.28] para $\mu=8.0$ y $\sigma=0.2$	99
Figura 11 Variación del pK medio con el pH en el rango lineal para $\mu = 7.5$	100
Figura 12. Variación de la pendiente de la ecuación [5.29] frente a σ .	101
Figura 13. Procedimiento para el cálculo del pK.	106
Figura 14. Equivalentes de base consumidos en la valoración de la proteína nativa y parcialmente hidrolizada	107
Figura 15. Equivalentes de base consumidos en la hidrólisis.	107
Figura 16. Curvas de valoración normalizadas.	108
Figura 17. Cálculo de CF según la ecuación [5.40].	109
Figura 18. Relación entre grado de hidrólisis y nitrógeno soluble.	113
Figura 19. Grado de hidrólisis y peso molecular medio de los péptidos.	115
Figura 20. Comparación de los pesos moleculares medios calculados teórica y experimentalmente.	116

Figura 21. Evolución de los pesos moleculares con el grado de hidrólisis.	118
Figura 22. Desactivación de la enzima.	121
Figura 23. Ajuste de la desactivación de la enzima a una cinética de primer orden.	122
Figura 24. Influencia de la concentración de enzima en el grado de hidrólisis para una concentración de sustrato $s_0 = 50$ g/L, $T = 50$ °C y $pH = 8.5$.	123
Figura 25 Influencia de la concentración de sustrato en el grado de hidrólisis para una concentración de enzima $e_0 = 0.50$ g/L, $T = 50$ °C y $pH = 8.5$.	124
Figura 26. Grado de hidrólisis frente a e_0t .	125
Figura 27. Grado de hidrólisis frente a e_0t/s_0 .	125
Figura 28 Ajuste mediante funciones spline cúbicas del grado de hidrólisis frente a la variable intensiva e_0t/s_0 .	129
Figura 29. Valores de k-factor de reactividad calculados en función del grado de hidrólisis.	130
Figura 30. Valores experimentales y simulados (en negro) con ec [5.80] de grado de hidrólisis frente al tiempo. o $s_0 = 25$ g/L, $e_0 = 0.25$ g/L; o $s_0 = 25$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L; o $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.05$ g/L; o $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L; o $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 2.50$ g/L; o $s_0 = 100$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L.	130
Figura 31. Valores experimentales y simulados (en negro) con las ec [5.81], [5.82] y [5.83] de grado de hidrólisis frente al tiempo. o $s_0 = 25$ g/L, $e_0 = 0.25$ g/L; o $s_0 = 25$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L; o $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.05$ g/L; o $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L; o $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 2.50$ g/L; o $s_0 = 100$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L.	131
Figura 32. Grado de hidrólisis y conversión a nitrógeno soluble	133
Figura 33. Curvas de nivel del grado de hidrólisis en función del tiempo y la relación E/S en el reactor discontinuo.	135
Figura 34. Curvas de nivel de la conversión en función del tiempo y la relación E/S en el reactor discontinuo.	136
Figura 35. Curvas de nivel de la capacidad en función del tiempo y la relación E/S en el reactor discontinuo.	137
Figura 36. Caudales de retenido frente a caída de presión para agua e hidrolizado	139
Figura 37. Relación entre caída de presión y caudal de retenido para agua e hidrolizado.	140
Figura 38, Relación entre presión transmembrana y caudal de filtrado para agua.	141
Figura 39. Caudales de filtrado frente a presión transmembrana para hidrolizado.	143

Figura 40. Relación entre presión transmembrana y caudal de filtrado para hidrolizado.	144
Figura 41. Hidrodinámica del módulo de membrana con hidrolizado.	145
Figura 42. Cromatograma del filtrado durante la ultrafiltración a recirculación total para un hidrolizado al 10 %.	146
Figura 43. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $V = 2$ L	150
Figura 44. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $V = 2$ L	150
Figura 45. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $V = 2$ L	151
Figura 46. Volumen de NaOH 2 N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $V = 2$ L	151
Figura 47. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 2$ L	153
Figura 48. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 2$ L	153
Figura 49. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 2$ L	154
Figura 50. Volumen de NaOH 2 N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 2$ L	154
Figura 51. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L	156
Figura 52. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L	156
Figura 53. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L	157
Figura 54. Volumen de NaOH 2N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L	157
Figura 55. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$	159
Figura 56. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L	159
Figura 57. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L	160
Figura 58. Volumen de NaOH 2 N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L	160
Figura 59. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 1.5$ L	162
Figura 60. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 1.5$ L	162
Figura 61. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 1.5$ L	163
Figura 62. Volumen de NaOH 2 N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 1.5$ L	163

- Figura 63. Grado de hidrólisis comparado del reactor discontinuo (curvas de nivel) y del reactor de membrana (puntos). 166
- Figura 64. Conversión comparada del reactor discontinuo (curvas de nivel) y del reactor de membrana (puntos). 167
- Figura 65. Capacidad comparada del reactor discontinuo (curvas de nivel) y del reactor de membrana (puntos). 168
- Figura 66. Cromatograma de un hidrolizado obtenido en el reactor de membrana. Condiciones de operación: $s_0 = 50 \text{ g/L}$, $E/S = 0.06$, $V = 2 \text{ L}$. 169

1. RESUMEN

1. RESUMEN

Los hidrolizados de proteínas tienen innumerables aplicaciones en la industria alimentaria por sus propiedades funcionales (solubilidad, poder emulsificante, mayor capacidad de adsorción, capacidad espumante) y nutricionales.

Estos hidrolizados se utilizan ampliamente como saborizantes de alimentos, espesantes, complementos proteicos para la preparación de bebidas estimulantes y fundamentalmente como fuente de nitrógeno para la formulación de alimentos infantiles y nutrición enteral clínica.

Las dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago. Los hidrolizados que entran en su formulación deben ser osmóticamente equilibrados, hipoalergénicos, presentar un alto valor nutritivo y tener un sabor agradable. Para ello la hidrólisis debe realizarse vía enzimática y los hidrolizados obtenidos estar constituidos mayoritariamente por di y tripéptidos.

La estrecha relación existente entre el tamaño de los péptidos obtenidos y las propiedades funcionales y nutricionales que presentan los hidrolizados exige un riguroso control del proceso de hidrólisis para asegurar las características del producto deseado.

Generalmente la producción de estos hidrolizados se lleva a cabo en reactores discontinuos. Sin embargo, los costes implicados en las reacciones discontinuas son altos debido a la cantidad de enzima requerida, el coste energético y la mano de obra. Además a estos factores puramente económicos, habría que añadir el alto contenido en aminoácidos libres, usualmente presentes en este modo de operación que pueden invalidar al producto en algunas de sus aplicaciones. La inmovilización de enzimas en un soporte sólido ha sido una de las técnicas ensayadas para solventar estas desventajas. No obstante la acusada pérdida de actividad de la enzima debido al proceso de inmovilización así como el alto coste del mismo junto con el frecuente atasco de los reactores de lecho fijo utilizados han sido también un problema.

El trabajo que se describe en esta Memoria forma parte de la labor investigadora que el Grupo de Biorreactores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada está llevando a cabo en el campo de la hidrólisis enzimática de proteínas.

En concreto en este trabajo se ha estudiado el proceso de hidrólisis enzimática en un reactor de membrana de proteínas del lactosuero para nutrición enteral.

Por su alto valor biológico, el sustrato seleccionado para esta investigación ha sido un concentrado de proteínas del lactosuero, Lactalbumin 75L, con un 76 % en peso de proteína. Las proteasas seleccionadas han sido las siguientes enzimas comerciales de grado alimentario: Alcalasa 0.6L,

Multifect P3000, Protex 6L y PEM 2500S. De ellas, la proteasa bacteriana Protex 6L ha resultado ser la más eficaz a pH = 8.5 y T = 50 °C para la hidrólisis de nuestro sustrato.

El estudio del proceso hidrólisis se ha realizado mediante las siguientes técnicas y dispositivos experimentales:

Medida del grado de hidrólisis

El seguimiento y control continuo de la hidrólisis pueden ser realizados por medida del consumo de agente neutralizante necesario para mantener constante el pH en el reactor o por medidas del descenso de la temperatura de congelación del producto obtenido. Sin embargo, ambas variables no están relacionadas de una forma simple con el grado de hidrólisis alcanzado, siendo necesario para establecer esta relación el valor del pK medio de los grupos liberados en la reacción.

$$x = \frac{M_B (1 + 10^{pK-pH})}{M_P h_T}$$

$$\Delta T = K_f \left(1 - A_\phi \sqrt{b_0 + \frac{s_0 h_T x}{1 + 10^{pK-pH}}} \right) \left(m_0 + i_0 + b_0 + s_0 h_T x \left(\frac{2 + 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}} \right) \right)$$

En este trabajo se demuestra que el valor del pK medio a emplear varía con el pH de trabajo y que puede calcularse a partir de los equivalentes/L de base consumidos en el desplazamiento del equilibrio de protonación de los grupos liberados por la hidrólisis con el pH. El método que se propone consiste en la valoración en el rango alcalino de la proteína de partida y de la proteína hidrolizada. El procedimiento seguido para el cálculo del pK del sistema proteínas del lactosuero-Protex 6L se representa en el diagrama:

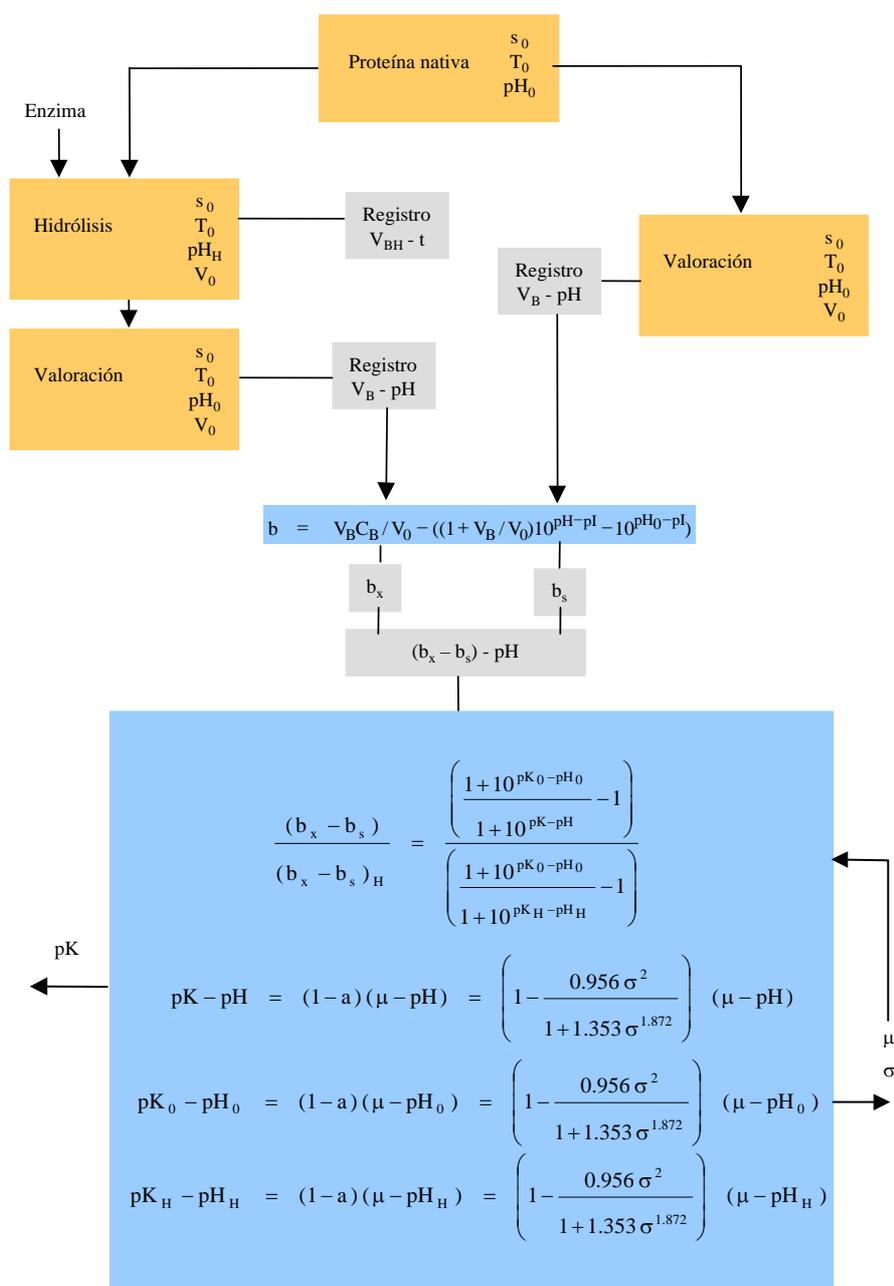
Se obtiene: $pK = 4.5609 + 0.3275 \text{ pH}$, $pK \text{ (a pH = 8.5)} = 7.34$

Medida de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determina según el siguiente ensayo normalizado: la proteína con una concentración de 10 g/L se digiere durante 15 min con la enzima adicionada a una dosis tal que la relación E/S sea 0.05, a pH = 8.5 y T = 50 °C. El pH se mantiene constante mediante la adición de NaOH 2 M. La actividad de la enzima se define como los moles de enlaces amido hidrolizados por gramo de enzima añadida.

La enzima utilizada no se desactiva en presencia de sustrato. Tampoco se detecta pérdida de actividad por la acción de la bomba o de la membrana.

1. RESUMEN



Determinación de la distribución de pesos moleculares y composición en aminoácidos

La distribución de pesos moleculares se realiza mediante cromatografía líquida de exclusión. Para determinar el perfil de aminoácidos de la proteína se requieren en general tres pasos: hidrólisis de la proteína hasta obtener aminoácidos libres, conversión de los aminoácidos en feniltiocarbamil derivados y análisis de éstos mediante cromatografía líquida de fase inversa.

Medida del índice de solubilidad de los péptidos

Se ha empleado el índice de solubilidad en ácido tricloroacético (TCA) al 13.6 %.

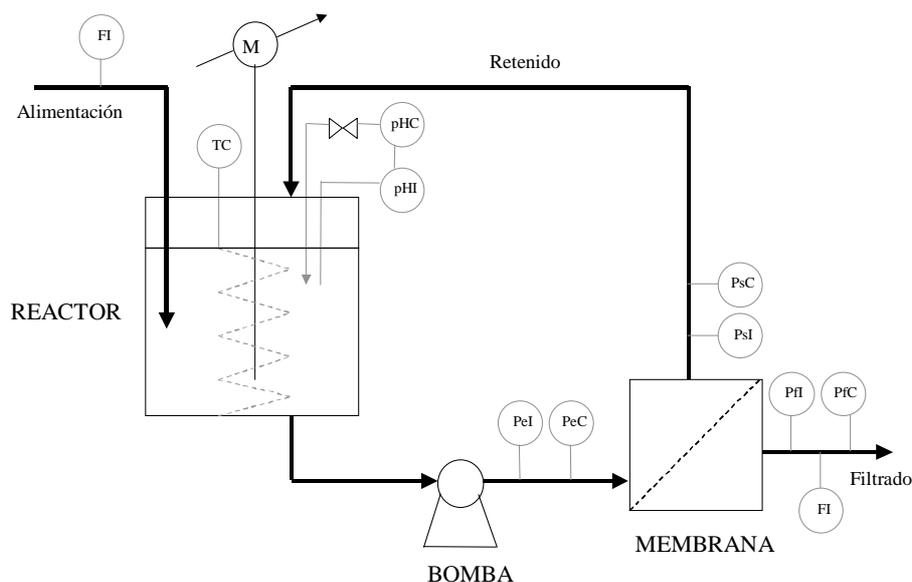
Determinación del potencial antigénico

Se realiza mediante un enzimoimmunoensayo de inhibición.

Reactor discontinuo

Constituido por un tanque agitado termostatzado con controles de temperatura, pH y toma de muestras.

Reactor de membrana



Constituido fundamentalmente por una unidad de reacción de 3 L de capacidad con controles de temperatura, pH y toma de muestras y un módulo de ultrafiltración tangencial de membranas de corte 3 kDa de la serie Omega de Pall Filtron de baja adsorción en proteína.

Para el cálculo de las velocidades de hidrólisis a diferentes extensiones de la reacción se han ajustado los resultados experimentales mediante funciones splines cúbicas.

Se ha encontrado que la cinética de la hidrólisis de proteínas séricas con la enzima Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C se ajusta a la ecuación de velocidad

$$s_0 \frac{dx}{dt} = k f_{\text{reactividad}} f_{\text{accesibilidad}} (x_{\text{max}} - x) e_0$$

con $x_{\text{max}} = 0.35$

$$f_{\text{accesibilidad}} = \frac{3}{n_x^{1/3}} + \frac{1}{n_x} - \frac{3}{n_x^{2/3}}, \quad n_x = \frac{n_0 (1-x)}{1+n_0 x}, \quad n_0 = 148$$

1. RESUMEN

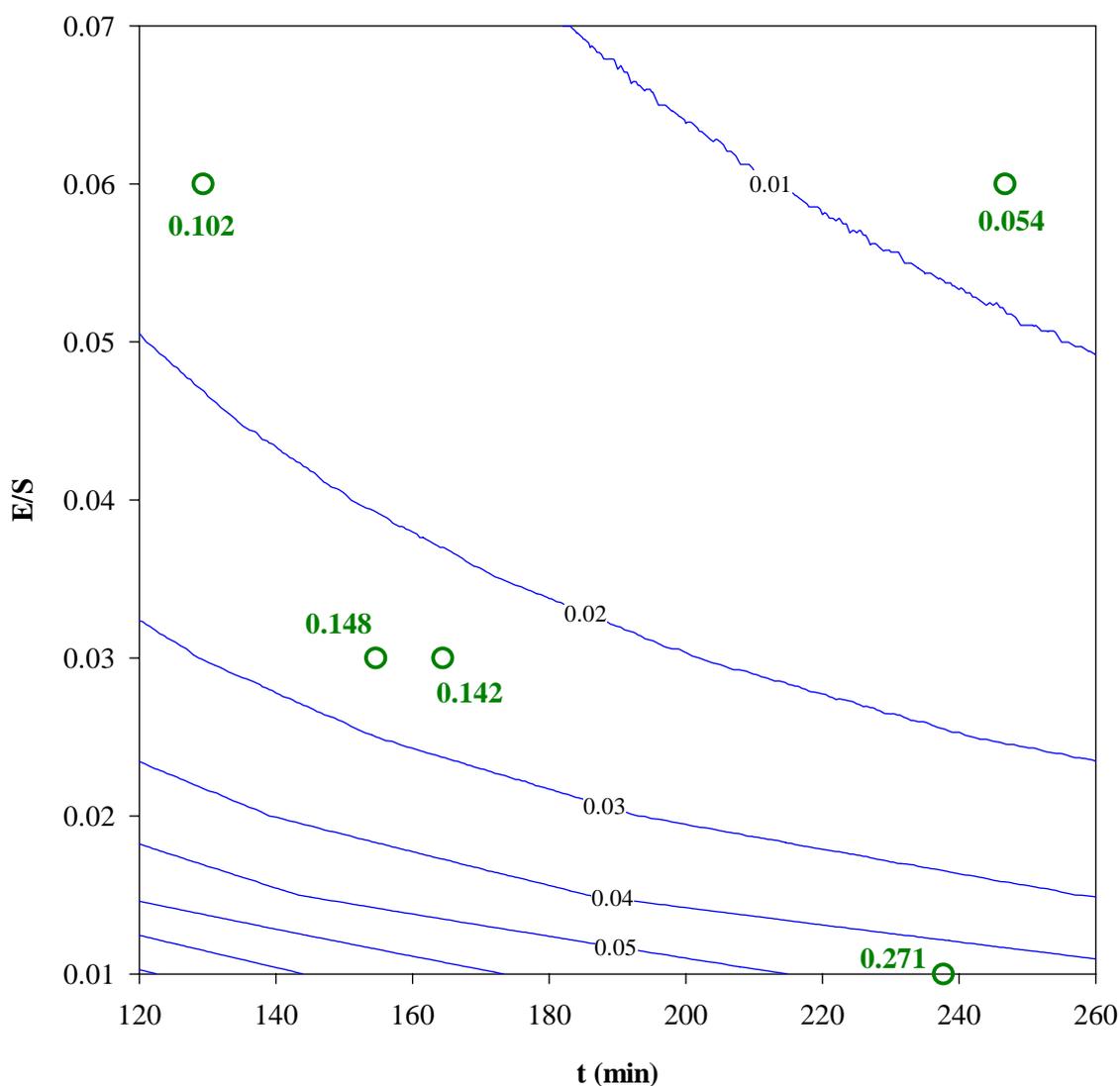
$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 4.274 \exp(-39.92 x) \quad x < 0.025$$

$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 1.841 - 12.087 x \quad 0.025 < x < 0.13$$

$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 3.585 \exp(-20.04 x) \quad x > 0.13$$

De acuerdo con la ecuación cinética obtenida, la variable intensiva del tratamiento enzimático es e_0t/s_0 , que permite optimizar las condiciones de operación necesarias para obtener un determinado grado de hidrólisis.

La realización de la hidrólisis en el reactor de membrana permite incrementar la capacidad del proceso de 5 a 6 veces respecto a los resultados obtenidos en el proceso discontinuo, lo que refleja la mayor eficiencia del reactor de membrana debida a una mejor utilización de la enzima. Es más, en el reactor discontinuo sólo se ha tenido en cuenta el tiempo de reacción, cuando, al sumar los tiempos de maniobra, la capacidad sería aun menor y la diferencia mayor.



1. RESUMEN

A caudales de recirculación que garanticen el barrido de la capa de polarización, el reactor de membrana es estable más de 16 horas.

Teniendo en cuenta los valores de capacidad obtenidos, la estabilidad demostrada de la operación y las ventajas inherentes de todo proceso continuo respecto al discontinuo, queda probada la conveniencia de realizar la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero en un reactor continuo de membrana.

Los hidrolizados obtenidos en este reactor cumplen las especificaciones requeridas para ser incluidos en formulación enteral: peso molecular medio menor de 500 Da y reducción del potencial antigénico del 99.97 % respecto a la proteína nativa.

2. INTRODUCCIÓN

El proceso de hidrólisis enzimática de biopolímeros tales como proteínas y polisacáridos, presentes en los alimentos, permite mejorar las características físico-químicas y la palatabilidad del alimento de partida, aumentando su digestibilidad sin pérdida del valor nutritivo. De esta forma, este tipo de procesos tiene un interés creciente dentro de la Industria Agroalimentaria, encontrando los hidrolizados obtenidos numerosas aplicaciones en la fabricación de alimentos preparados, productos dietéticos y nutrición infantil y clínica (Adler-Nissen, 1986; Samuelsson y Poulsen, 1987; Boza *et al.*, 1995; Perea y Ugalde, 1996).

2.1. Hidrolizados de proteínas.

Los hidrolizados de proteínas se utilizan para modificar las propiedades funcionales de los alimentos (solubilidad, adsorción, poder emulsificante y espumante), como suplemento en algunas bebidas y refrescos y como fuente de nitrógeno en la preparación de dietas enterales para lactantes y adultos enfermos.

Mediante la hidrólisis se puede eliminar la alergenicidad de la proteína de partida, lo cual se consigue para pesos moleculares inferiores a 6000 (Tossavainen *et al.*, 1983; Samuelsson y Poulsen, 1987), aunque otros autores colocan el límite a cortes más bajos: 3500 (Otani *et al.*, 1990) o incluso 1200 (Knights, 1985).

Por otra parte, durante el proceso se desarrolla un sabor amargo característico que está relacionado con la hidrofobicidad de las cadenas laterales de los aminoácidos y suele ser debido a péptidos relativamente pequeños, de pesos moleculares comprendidos entre 1000 y 6000 (Ney, 1979; Otagiri *et al.*, 1983).

2.1.1. Química de la rotura del enlace peptídico.

La reacción de hidrólisis consiste en la rotura del enlace existente entre los aminoácidos que componen la cadena peptídica, consumiéndose una molécula de agua por cada enlace roto



De esta forma es un proceso que transcurre a través de un conjunto de etapas en serie:

proteínas \Rightarrow proteosas \Rightarrow peptonas \Rightarrow péptidos \Rightarrow aminoácidos

Cada una de estas especies intermedias, se diferencia básicamente de las otras en su solubilidad, y se corresponde aproximadamente con los pesos moleculares medios (PM) y con la relación nitrógeno amino / nitrógeno total (NA/NT) que se recogen en la Tabla 1 (Knights, 1985).

2. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Características de las especies producidas en la hidrólisis de proteínas.

	PM	NA/NT
Proteínas	> 20000	< 0.01
Proteosas	5000 – 10000	< 0.01
Peptonas	1000 – 6000	0.1 - 0.5
Péptidos	200 – 500	0.5 - 0.8
Aminoácidos	75 – 200	0.8 - 0.9

La hidrólisis de proteínas puede realizarse por vía química o enzimática. La hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la tradicional hidrólisis química, ácida o alcalina, entre las que cabe mencionar las siguientes:

- Selectividad. Las proteasas son específicas para un tipo determinado de enlace y, por tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control conduce inevitablemente a la aparición de productos no deseados que pueden llegar a ser tóxicos.
- Realización del proceso a temperatura y pH moderados. La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a 60°C y pH comprendido entre 4-8
- No adición de otras sustancias. Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior del hidrolizado eleva considerablemente el contenido en sales del mismo.
- Se mantiene el valor nutritivo, ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

No obstante, en los procesos enzimáticos es necesario separar o desnaturalizar la enzima y trabajar en condiciones asépticas, ya que al ser la hidrólisis un proceso relativamente lento, puede producirse contaminación microbiana del hidrolizado. Sin embargo, la desnaturalización térmica de

2. INTRODUCCIÓN

las enzimas (Camacho *et al.*, 1992) o su separación por procesos de membrana son temas resueltos por la tecnología actual y la necesidad de asepsia es una característica general de la industria alimentaria.

Según Svendsen (1976), la catálisis realizada por la principal clase de proteasas, serinoproteasas, ocurre en tres etapas consecutivas: 1) Formación de un complejo entre sustrato y enzima. 2) Rotura del enlace peptídico para liberar uno de los péptidos resultantes. 3) Ataque nucleofílico sobre el resto del complejo para separar el otro péptido y reconstituir la enzima libre.

Los grupos carboxilo y amino libres formados tras la hidrólisis estarán más o menos ionizados dependiendo del pH, según los siguientes equilibrios:



Los valores de pK, a 25 °C, de estos grupos en el polipéptido se estiman entre 3.1-3.6 y 7.5-7.8 respectivamente (Steinhardt y Beychok, 1964; Rupley, 1967).

El reparto de las diferentes especies iónicas en función del pH se resume en la Figura 1.

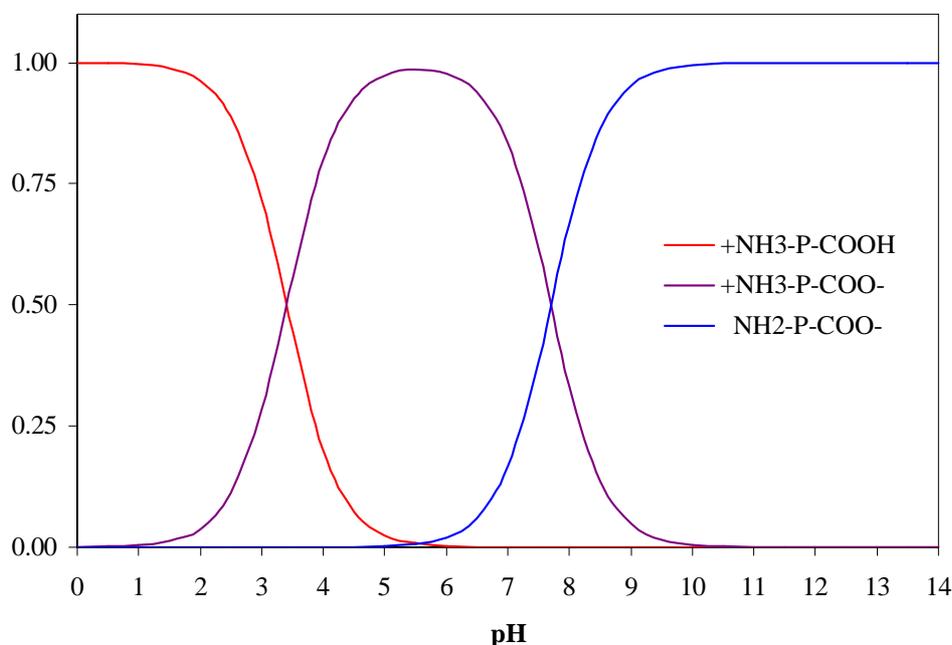


Figura 1. Reparto de las diferentes especies iónicas de un polipéptido en función del pH

2. INTRODUCCIÓN

El grupo carboxilo estará por tanto protonado a pH inferior a 2, parcialmente disociado entre pH 2 y 5 y totalmente disociado para pH mayor de 5. Asimismo el grupo amino estará protonado para pH menor de 6, parcialmente protonado entre pH 6 y 9.5 y desprotonado por encima de pH 9.5.

De lo anterior se desprende que la hidrólisis de proteínas viene acompañada de una liberación o consumo de protones (Adler-Nissen, 1986). Así, el pH cambiará durante la reacción excepto en el rango pH 5-6, donde liberación y consumo se cancelan. Por debajo de pH 3.1-3.6, menos de la mitad de los grupos carboxilo estarán disociados y los grupos amino estarán totalmente protonados. Un consumo de 0.5-1.0 equivalentes de protones tendrá lugar con la rotura de cada enlace. Si el pH no es controlado, se producirá un rápido incremento del mismo. Por otra parte, a valores de pH superiores a 7.5-7.8, menos de la mitad de los grupos amino estarán protonados pero los grupos carboxilos estarán totalmente disociados. Esto conduce a una liberación de 0.5-1.0 equivalentes de protones por cada equivalente de enlaces rotos y como resultado, el pH disminuirá si no es controlado. Por tanto, a valores de pH fuera del rango dado por los valores de pK de los grupos amino y carboxilo, la reacción de hidrólisis consumirá considerables cantidades de ácido o base, a pH constante. En la Tabla 2 se recogen los valores de pK a 25°C de algunos aminoácidos y péptidos.

Tabla 2 Valores de pK para varios aminoácidos y péptidos a 25 °C. (Voet y Voet, 1990)

	$pK_{1\alpha-COOH}$	$pK_{2\alpha-NH_3^+}$
Alanina	2.34	9.69
Glicina	2.34	9.60
Serina	2.21	9.15
Gly-Gly	3.06	8.13
Gly-Gly-Gly	3.26	7.91
Gly-Ala	3.17	8.23
Ala-Gly	3.16	8.24
Ala-Ala-Ala-Ala	3.42	7.94
Ala-Ala-Lys-Ala	3.58	8.01

En cuanto a la extensión de la hidrólisis o rotura de enlaces, va a depender de la especificidad de la enzima empleada y de la naturaleza del sustrato. No cada enlace susceptible de ser hidrolizado lo es.

Además, para las proteínas globulares algunos enlaces pueden ser inaccesibles debido a la configuración de las estructuras terciaria y cuaternaria; por lo que una proteasa romperá menos enlaces en una proteína globular en su estado nativo que en una proteína que ha sido parcialmente desnaturalizada.

2.1.2. Propiedades funcionales y nutricionales de los hidrolizados.

El efecto que la hidrólisis enzimática de las proteínas de los alimentos tiene en las propiedades funcionales y nutricionales de éstas, ha sido estudiado por numerosos investigadores y recogido en un gran número de artículos (Adler-Nissen, 1986; Chobert *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1990; Casella y Whitaker, 1990; Mahmoud *et al.*, 1992; Mannheim y Cheryan, 1992; Krause y Schewenke, 1995; Boza *et al.*, 1994 y 1995).

En general, la hidrólisis mejora la solubilidad de las proteínas. Este hecho es especialmente importante en el caso de las proteínas de cereales que son poco solubles en medio acuoso. La proteína de maíz es muy insoluble a pH 2-5, mientras que tan sólo con un grado de hidrólisis del 2% aumenta su solubilidad a un 30-50% en este rango de pHs (Casella y Whitaker, 1990), y el gluten de trigo es 7 veces más soluble a pH 7 si se hidroliza en torno a un 10 % (Tschimirov *et al.*, 1983).

El proceso de hidrólisis incrementa también la adsorción de humedad por parte de la proteína (Mohri y Matsuchita, 1984; Ponnampalam *et al.*, 1987). Esto es debido a que la adsorción de agua está relacionada con el número de grupos iónicos presentes, los cuales aumentan como resultado de la rotura del enlace peptídico .

Asimismo, se ha comprobado que las propiedades emulsificantes de las proteínas están íntimamente relacionadas con el tamaño de la cadena peptídica y por tanto con el grado de hidrólisis (Zakaria y McFeeters, 1978; Adler-Nissen y Olsen, 1979). Hidrolizados de caseína o proteína de soja al 1-2 % presentan una mayor actividad emulsificante que la proteína nativa, sin embargo, esta actividad es significativamente más baja a grados de hidrólisis superiores. Este efecto beneficioso de la hidrólisis limitada en la actividad emulsificante puede ser debido a la exposición de grupos hidrofóbicos antes ocultos, que pueden mejorar el balance hidrofóbico-hidrofílico y favorecer la emulsificación. En cambio, la disminución de actividad por digestión excesiva se relaciona con la pérdida de la estructura globular de la proteína, dando lugar a una capa más fina de material proteínico alrededor de la gota de aceite y por tanto a una emulsión menos estable (Phillips y Beuchat, 1981; Schwenke *et al.*, 1995).

2. INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios (Halling, 1981) han demostrado a su vez que la proteólisis aumenta el poder espumante de las proteínas pero que disminuye la estabilidad de la espuma formada. Obviamente, la rotura de enlaces y el desdoblamiento de la proteína por el proceso hidrolítico favorece el reagrupamiento de péptidos y la formación de una película en la interfase agua-aire. Sin embargo, la película formada no es lo suficientemente gruesa ni viscoelástica para proveer de estabilidad a la espuma.

Desde el punto de vista nutricional, el proceso de hidrólisis enzimática aumenta la digestibilidad de las proteínas y favorece su absorción intestinal sin pérdida de valor nutritivo. Así, una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas.

Especial mención merece, por el alto valor añadido de los productos obtenidos, las fórmulas enterales con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos. Estas dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos (Lebenthal *et al.*, 1983).

Las características que debe cumplir un hidrolizado de proteínas para formar parte de una dieta enteral son: 1) que sea osmóticamente equilibrado; 2) que sea hipoalérgico; 3) presentar un alto valor nutritivo, comparable al de la proteína de partida y 4) tener un sabor agradable. Por ello no es conveniente que estas dietas estén constituidas sólo por aminoácidos libres, ya que esto las hace hiperosmóticas, provocando secreción intestinal y diarrea. Además, los conocimientos actuales del mecanismo de la absorción intestinal indican que los di o tripéptidos se absorben con mayor facilidad que los aminoácidos libres (Grimble y Silk, 1989). También se conoce que los problemas de alérgenicidad son debidos a la presencia en el hidrolizado de proteínas y péptidos de alto peso molecular, y que durante el proceso de hidrólisis se produce un cierto amargor. Pero en cualquier caso, ambos factores desaparecen para productos formados por péptidos de peso molecular inferior a 1000 Da (Otani *et al.*, 1990). Por todo ello, hidrolizados con peso molecular medio alrededor de 500 Da, constituidos fundamentalmente por di y tripéptidos, son la base proteínica buscada para la preparación de estas fórmulas.

Pero es el descubrimiento de la actividad opioide de ciertos péptidos derivados de la digestión parcial de proteínas lácteas, tanto fracciones caseínicas como séricas, y gluten de trigo, lo que está introduciendo un nuevo criterio en el concepto de *valor nutritivo* de las proteínas alimentarias y

2. INTRODUCCIÓN

abriendo todo un universo de posibilidades en el campo de la hidrólisis de proteínas orientadas a la obtención y caracterización de estos biopéptidos (Loukas *et al.*, 1983; Chiba y Yoshikawa, 1986; Schlimme *et al.*, 1989; Fukudome y Yoshikawa, 1992; Schlimme y Meisel, 1995). Realmente, el papel de los péptidos bioactivos derivados de proteínas alimentarias como sustancias reguladoras exógenas es aún un problema sin resolver. Se sabe, que los péptidos que están en estado inactivo en la proteína pueden ser liberados por un proceso digestivo en vivo, y que pueden actuar como potenciales moduladores fisiológicos del metabolismo durante el proceso de absorción intestinal.

Por analogía con los péptidos opioides endógenos, *endorfinas*, los péptidos opioides provenientes de proteínas alimentarias ha sido llamados *exorfinas*. Algunos de estos péptidos se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3. Péptidos opioides.

Secuencia	Nombre	Origen y posiciones de la secuencia en la proteína	Referencia
Péptidos endógenos:			
Tyr Gly Gly Phe Leu	Leu/encefalina		Loukas <i>et al.</i> (1983)
Exorfinas de proteínas lácteas:			
Arg Tyr Leu Gly Tyr Leu Glu	Exorfina de α -caseína	$\alpha_{s,1}$ -caseína bovina (90-91)	
Tyr Pro Phe Pro Gly	β -casomorfina 5	β -caseína bovina (60-65)	Henschen <i>et al.</i> (1979)
Tyr Gly Leu Phe – NH ₂	α -lactorfina	α -lactoalbúmina humana y bovina (50-53)-NH ₂	Chiba y Yoshikawa (1986)
Tyr Leu Leu Phe – NH ₂	β -lactorfina	β -lactoglobulina bovina (102-105)-NH ₂	Chiba y Yoshikawa (1986)
Tyr Pro Ser Tyr – OCH ₃	Casoxina 4	$\alpha_{s,1}$ -caseína bovina (35-38)-OCH ₃	Chiba y Yoshikawa (1986)
Exorfinas de gluten de trigo:			
Gly Tyr Tyr Pro	A4	HMW glutenina	Fukudome y Yoshikawa (1992)
Tyr Gly Gly Trp	B4	Sin determinar	Fukudome y Yoshikawa (1992)
Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Phe	Gliadorfina	α -gliadina (43-49)	Graf <i>et al.</i> (1987)

2.1.3. Sustratos.

Normalmente la elección de la fuente proteínica a utilizar en el proceso de hidrólisis se realiza en función del uso final que vaya a tener el hidrolizado y del valor añadido conseguido con respecto al sustrato de partida.

Las proteínas de pescado cobraron interés en los 60, manteniéndose desde entonces. Hay varias dificultades en la preparación de productos funcionales a partir de proteínas de pescado, de los cuales el principal es el desarrollo de sabores extraños. Sin embargo, mediante modificación enzimática se obtienen productos interesantes tanto funcional como organolépticamente (Groninger, 1973; Spinelli et al., 1975).

La ovoalbúmina del huevo es una proteína muy valiosa funcionalmente y difícil de hidrolizar debido a que contiene inhibidores enzimáticos (Horn, 1980). Es necesario coagular térmicamente la proteína y pretratar con pancreatina (Lin y Lee, 1983; Melachouris et al., 1983) para obtener hidrolizados solubles y de buen sabor.

Una hidrólisis limitada mejora la capacidad emulsificante de las proteínas de carne (Smith y Brekke, 1984). Un tratamiento más extenso dará lugar a un hidrolizado soluble y carente de amargor. La sangre procedente de los mataderos es una fuente infrautilizada de proteína alimentaria. El plasma, obtenido por centrifugación, presenta propiedades emulsificantes y termocoagulantes excelentes y es, por tanto, una proteína funcional útil en emulsiones de carne.

El interés en la hidrólisis de colágeno se dirige principalmente a la producción de gelatina (Petersen, 1981) la cual es una proteína funcional tradicional de alto valor por su capacidad de formar geles transparentes.

Dentro de las proteínas de cereales, el gluten de trigo destaca por sus propiedades viscoelásticas (Sarkki, 1979). La hidrólisis parcial de gluten mejora la capacidad emulsificante (Tschimirov et al., 1983). La proteína del maíz es un subproducto en la obtención de almidón y su capacidad de ligar agua se incrementa marcadamente tras un tratamiento con proteasas (Adler-Nissen, 1978 a).

Cuando la finalidad del hidrolizado es su uso como fuente de nitrógeno, se usan proteínas de pescado (Mackie, 1982) y proteínas microbianas (SCP) en alimentación animal, y proteínas de soja y lácteas en alimentación humana por su alto valor biológico (Nakamura et al., 1993; Baró et al., 1995; Boza et al., 1995).

La calidad de una proteína viene determinada por diferentes parámetros como la eficiencia proteica (PER: relación entre ganancia en peso corporal y peso de proteína consumida), el valor biológico

2. INTRODUCCIÓN

(BV: proporción de proteína absorbida que es retenida en el cuerpo para mantenimiento y/o crecimiento), digestibilidad (D: porcentaje de proteína retenida) y la utilización neta de proteína (NPU: proporción de proteína ingerida que es retenida). En la Tabla 4 se muestran valores medios de la calidad de algunas proteínas.

Tabla 4. Calidad proteica de algunas proteínas alimentarias.

	BV	D	NPU	PER
Leche	84.5	96.9	81.6	3.09
Caseína	79.7	96.3	72.1	2.86
Lactoalbúmina	82.0	97.0	79.5	3.43
Proteína de soja			61.0	
Gluten de trigo			35.0	

La proteína ideal tendría una NPU de 100, mientras que una proteína completamente carente en uno o más aminoácidos esenciales tendría una NPU de cero. Las proteínas de la leche de vaca presentan los valores más altos. Esto, junto con el bajo amargor de sus hidrolizados y bajo potencial antigénico hace de ellas el sustituto ideal de la leche materna. En la Tabla 5 se muestran algunas características de las fracciones proteicas de la leche y en la Tabla 6 su distribución en aminoácidos, que como puede observarse se asemeja a las necesidades en el hombre.

Sólo en aminoácidos cisteína y metionina es la leche de vaca ligeramente limitada comparada con los requerimientos de aminoácidos esenciales en el adulto. El exceso relativo del aminoácido lisina hace a las proteínas lácteas valiosas como suplemento en proteínas vegetales, particularmente de cereales, bajas en lisina.

2. INTRODUCCIÓN

Tabla 5. Distribución de proteínas de la leche.

Proteína	Contenido en leche entera (g/L)	Punto isoelectrico	Peso molecular
Proteínas totales	36.0		
Caseínas totales	29.5		
α_1 -Caseína	11.9	4.1	23000-27000
α_2 -Caseína	3.1	4.1	23000
β -Caseína	9.8	4.5	24000
κ -Caseína	3.5	4.1	19000
γ -Caseína	1.2	5.8-6.0	21000
Proteínas de lactosuero	6.3		
α -lactoalbúmina	1.2	4.2-4.5	14400
β -lactoglobulina	3.2	5.3	39000
Seroalbúmina	0.4	4.7	69000
Inmunoglobulinas	0.8	5.6-6.0	150000-1000000
Proteosas-Peptonas	1.0	3.3-3.7	4100-20000

2. INTRODUCCIÓN

Tabla 6. Distribución de aminoácidos en la leche.

Aminoácidos	Requerimiento en adultos (g/día)	Contenido en sólidos lácteos magros (mg/g)	Contenido en leche entera (g/250mL)
<i>Esenciales</i>			
Histidina	0.84	10.31	0.286
Isoleucina	0.70	22.98	0.497
Leucina	0.98	37.16	0.767
Lisina	0.84	30.12	0.652
Metionina	0.91	9.50	0.206
Fenilalanina	0.98	18.34	0.397
Treonina	0.49	17.12	0.371
Triptófano	0.25	5.34	0.115
Valina	0.7	25.39	0.550
<i>No esenciales</i>			
Alanina		13.10	0.283
Arginina		13.76	0.298
Ácido aspártico		28.79	0.624
Cisteína		3.50	0.076
Ácido glutámico		79.48	1.722
Glicina		8.04	0.174
Prolina		36.78	0.797
Serina		20.66	0.448
Tirosina		18.34	0.397

2.1.4. Proteasas.

Una enzima es una proteína con propiedades catalíticas debido a su poder de activación específica. En tecnología enzimática, la palabra “enzima” no sólo abarca la definición anterior, sino que

2. INTRODUCCIÓN

también es usado como sinónimo para los preparados enzimáticos. La mayoría de los preparados enzimáticos contienen varias enzimas individuales y otros compuestos que han sido añadidos para estandarizar y estabilizar el preparado.

Las enzimas comerciales de grado alimentario son suministradas generalmente en forma líquida o en pellets secos, que hacen su manejo más fácil y seguro. La presencia de varias enzimas individuales en un preparado es también ventajosa en muchos casos desde un punto de vista práctico. En otros, sólo se utiliza el componente principal, pero si los demás componentes no catalizan reacciones no deseadas, esto no supone ningún problema.

Las proteasas se clasifican de acuerdo a la fuente de la que proceden (animal, vegetal, bacteriana o fúngica), su acción catalítica (endopeptidasas o exopeptidasas) y la naturaleza del sitio catalítico. En hidrólisis de proteínas alimentarias siempre se utilizan endopeptidasas, pero ocasionalmente éstas se combinan con exopeptidasas para conseguir una mayor degradación.

Atendiendo a la naturaleza del sitio catalítico, las endopeptidasas se clasifican en 4 grupos: serinoproteasas, cisteínoproteasas, metaloproteasas y aspartatoproteasas. Las serinoproteasas (excepto algunas derivadas de *Streptomyces*) tienen su máxima actividad a pH alcalino. Su centro catalítico es el grupo $-OH$. Pertenecen a este grupo, por ejemplo, la tripsina, quimotripsina y la subtilisina. Las cisteínoproteasas están estrechamente relacionadas con las anteriores, siendo su centro catalítico el grupo $-SH$. Estas enzimas, características de las plantas aunque también son producidas por microorganismos, son sensibles al oxígeno. Su máxima actividad se encuentra a valores de pH más neutros que las serinoproteasas. Algunos ejemplos son la papaína y la bromelaína. Las metaloproteasas contienen un átomo metálico, normalmente Zn y tienen un pH óptimo cercano a la neutralidad. Su estabilidad aumenta en presencia de Ca^{2+} , mientras que agentes quelantes como el EDTA la inhiben ya que retiran el átomo de Zn (Aunstrup, 1980). Las aspartatoproteasas tienen un grupo carboxilo procedente de un residuo de ácido aspártico en el centro activo. Su uso es muy común y presentan máxima actividad a pHs ácidos. La pepsina y la quimosina son algunos ejemplos.

En la Tabla 7 se recogen algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado.

2. INTRODUCCIÓN

Tabla 7. Proteasas comerciales.

Origen	Enzima	Fuente	pH _{operación}	T _{operación} (°C)
Animal	P.E.M. 2500 S	Bovino-porcino	6 < pH < 10	20 < T < 60
	Corolase PP	Bovino-porcino	7 < pH < 9	45 < T < 55
Vegetal	Bromelaína takamina	Piña	4 < pH < 9	20 < T < 65
	Papaína takamina	Papaya	6 < pH < 8	20 < T < 75
Bacteriano	Neutrase	<i>B. subtilis</i>	6 < pH < 8	45 < T < 55
	Multifect P-3000	<i>B. subtilis</i>	7 < pH < 10	20 < T < 65
	Protex 6L	<i>B. licheniformis</i>	7 < pH < 10	25 < T < 70
	Alcalase 0.6L	<i>B. licheniformis</i>	4 < pH < 11.5	50 < T < 60
Fúngico	Fungal-Protease	<i>A. oryzae</i>	6 < pH < 9	45 < T < 55
	Corolase PS	<i>A. oryzae</i>	5 < pH < 7	50 < T < 60
	Corolase 7092	<i>A. oryzae</i>	6 < pH < 9	35 < T < 45
	Corolase 7093	<i>A. oryzae</i>	7 < pH < 9	40 < T < 50
	Corolase 7107	<i>A. niger</i>	2 < pH < 3	30 < T < 50

2.1.5. Estudios del proceso.

Las investigaciones realizadas en el campo de la hidrólisis enzimática de proteínas lácteas se pueden agrupar en dos líneas fundamentales: por un lado, muchos autores se han centrado en encontrar las condiciones óptimas en las que realizar el proceso para obtener hidrolizados de alta calidad minimizando costes y, por otra parte, otros autores han estudiado la cinética de la hidrólisis.

Jost y Monti (1977) estudiaron la hidrólisis enzimática parcial de proteínas del lactosuero, con y sin separación de la lactosa, por tripsina porcina, estableciendo las condiciones óptimas de la reacción en pH = 8 y T = 55 °C. La enzima utilizada fue tripsina cristalina Novo 4500 K, con 25 UA/g y una relación E/S = 0.01. En las condiciones indicadas se alcanzó un grado de hidrólisis del 8 % en 3 h.

2. INTRODUCCIÓN

El hidrolizado obtenido estaba formado mayoritariamente por péptidos de 500 a 5000 Da, junto con una pequeña porción de aminoácidos libres, fundamentalmente arginina y lisina.

Camus *et al.* (1980) estudiaron comparativamente la hidrólisis de caseína y glúten de trigo por enzimas pancreáticas: tripsina y quimotripsina. Estos autores siguieron el desarrollo de la hidrólisis por medida del nitrógeno total en la fracción soluble en ácido tricloroacético 0.6 M (péptidos + aminoácidos) y en ácido fosfotúngstico 0.01 M (aminoácidos). Sin embargo, no interpretaron cinéticamente sus resultados, sino que sólo compararon la proteólisis de los dos sustratos utilizados llegando a la conclusión de que, en general, la caseína es más fácilmente hidrolizable aunque esta diferencia depende de la relación E/S utilizada.

Chobert *et al.* (1988) estudiaron la hidrólisis con tripsina de caseína y concentrados de proteínas de suero hasta diferentes grados de hidrólisis (4.3, 8.0, 9.9 % para la caseína y 2.5, 3.9, 5.3 % para el WPC), con una concentración inicial de sustrato del 5 %, una relación E/S del 0.5–1 %, pH = 8.0 y T = 37 °C. Para la caseína, todos los péptidos obtenidos tenían tamaños moleculares inferiores a 15000, existiendo una gran proporción de péptidos de tamaño molecular inferior a 5000. Para el WPC, los picos principales se obtuvieron a 18000, 13000, 9000 y 5000 tras el 2.5 % de hidrólisis; a 9000 y 5000 tras el 3.9 % y cerca de 6000 y 2000 tras el 5.3 % de hidrólisis. Estudiaron los cambios en la solubilidad y propiedades emulsificantes de los hidrolizados, obteniéndose los siguientes resultados:

- La solubilidad de los hidrolizados de caseína aumentó sólo a pH = 4-5, mientras que para los hidrolizados de WPC fue mayor con respecto al sustrato de partida para todos los pHs.
- La capacidad emulsificante aumentó para los hidrolizados de caseína en su punto isoeléctrico, mientras que para los de WPC aumentó a pH alcalino.
- La actividad emulsificante fue mayor para los hidrolizados de caseína con respecto a la proteína bruta, y mucho mayor para los de WPC.
- La estabilidad de emulsión fue mayor para los hidrolizados de WPC que para los de caseína, y en ambos casos mayor que la de la proteína bruta.

Herbert y Dunnill (1989) compararon la acción de subtilisina A soluble e inmovilizada para conseguir modificaciones limitadas y bien definidas de proteínas de soja en diferentes configuraciones de reactores, utilizando SDS-PAGE para establecer la distribución de pesos moleculares del hidrolizado obtenido. Aunque analizaron la variación con el tiempo de las

2. INTRODUCCIÓN

fracciones de péptidos de diferentes pesos moleculares tanto para la enzima soluble como inmovilizada, no abordaron una interpretación cinética de sus resultados.

Mietsch *et al.* (1989) prepararon hidrolizados de proteínas de soja y de leche con Alcalase 0.6L y Neutrase 0.5L determinando las propiedades funcionales de los hidrolizados y tratando de relacionarlas con el grado de hidrólisis alcanzado, encontrando que la actividad emulsificante mejora mucho con bajos grados de hidrólisis, por debajo del 10 %. El efecto del tratamiento enzimático en el caso de las proteínas lácteas no es tan acusado como en el caso de proteínas de soja.

Leaver y Dalgleish (1990) estudiaron la topografía de la α -caseína bovina mediante su hidrólisis con tripsina en una interfase agua-aceite de soja, identificando los péptidos obtenidos por su composición en aminoácidos. La α -caseína soluble fue hidrolizada inicialmente en un número de enlaces sensibles a la tripsina, mientras que la hidrólisis de la proteína en la interfase fue un proceso más ordenado, lo que sugiere que la mayoría de las moléculas de α -caseína es inaccesible a la enzima, y en la interfase aceite-agua, los macropéptidos se reordenan y otras regiones hidrofílicas se vuelven accesibles a la enzima.

Guillou *et al.* (1991) llevaron a cabo la hidrólisis de α -caseína por quimosina bovina y pepsina A para comparar la hidrólisis de las dos enzimas sobre esta proteína. Ensayaron diferentes condiciones para cada enzima (pH = 5.5, t = 116 h; pH = 3.5, t = 7 h; E/S = 0.01 para la quimosina; pH = 3.0, t = 24 h, E/S = 0.001 para la pepsina A). La especificidad de las dos enzimas fue parecida, si bien la hidrólisis de α -caseína por ambas enzimas fue bastante diferente, como puede deducirse del análisis de los péptidos formados en cada caso. Algunos de los péptidos identificados contenían secuencias con posibles papeles fisiológicos.

Schmidt y Poll (1991) hidrolizaron α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina en soluciones tampón usando diferentes enzimas proteolíticas. Las condiciones ensayadas fueron pH = 8.0, T = 30 °C, s_0 = 10 g/L, E/S = 0.01, estudiándose los hidrolizados por electroforesis en gel. La acción de la misma enzima sobre la α -la o la β -lg fue diferente, y dependía de la composición del medio, de la temperatura de incubación, del grado de desnaturalización de la proteína y del pH. La α -la es hidrolizada por quimotripsina, subtilisina, proteinasa K, pepsina y pronasa y más lentamente por pancreatina y elastasa, siendo sólo ligeramente hidrolizada por tripsina, papaína, bromelaína y quimosina y nada por colagenasa, termolisina y tripsina y pancreatina en presencia de Ca^{+2} . La β -lg es rápidamente hidrolizada por subtilisina y proteinasa K, y más lentamente por quimotripsina,

2. INTRODUCCIÓN

tripsina y pancreatina en presencia de Ca^{+2} , por elastasa, papaína, bromelaína, pronasa y termolisina, siendo sólo ligeramente hidrolizada por pancreatina en ausencia de Ca^{+2} , y nada por tripsina en ausencia de Ca^{+2} , pepsina, quimosina, colagenasa y dispasa. Durante la hidrólisis de α -la con quimotripsina, elastasa y pronasa, y de β -lg con quimotripsina, papaína, bromelaína y pronasa se formaron péptidos con tamaño molecular entre 2000 y 5000 en cantidades apreciables, mientras que en los demás casos se formaron péptidos pequeños no detectables por electroforesis.

Chobert *et al.* (1991) usaron tripsina para controlar los cambios que el pH induce en la conformación y en la hidrólisis de la β -lg. Las condiciones ensayadas fueron $\text{pH} = 7.5 - 9.0$, $T = 37$ °C, $s_0 = 1$ g/L y $E/S = 0.025$. Se puso de manifiesto la existencia de diferencias en los sitios específicos de rotura, predominando los cortes simétricos a $\text{pH} = 7.5 - 8.0$ y roturas asimétricas a $\text{pH} = 8.5 - 9.0$. Esto se debe a que al variar el pH varía la configuración estructural de la β -lg y por tanto su accesibilidad a la hidrólisis.

Haque y Antila (1993) hidrolizaron caseinato cálcico usando diferentes enzimas para obtener preparaciones de péptidos. Las condiciones de operación fueron $T = 37$ °C, $\text{pH} = 6.0 - 7.5$ y relación $E/S = 1/200$. Se recuperaron las fracciones de péptidos presentes en el suero bruto por concentración por ultrafiltración y se añadieron al caseinato cálcico en una proporción de 10 – 20 % para observar su efecto sobre la actividad de algunas proteasas. Todas las preparaciones de péptidos disminuyeron la actividad de la enzima. El grado de concentración de los péptidos por ultrafiltración está relacionado con el grado de inhibición que producen sobre las enzimas.

Schmidt y van Markwijk (1993) estudiaron la hidrólisis de α -la y β -lg con pepsina a 40 °C y $\text{pH} = 2.5$ y con papaína a 40 °C y $\text{pH} = 8.0$, analizando la influencia sobre la hidrólisis de la desnaturalización previa de la proteína con calor (8 min a 82 °C). La α -la es hidrolizada rápidamente por pepsina pero no por papaína, incluso tras el precalentamiento. La β -lg no es hidrolizada por la pepsina, pero sí lo es parcialmente tras el precalentamiento, que produce un desdoblamiento en la cadena polipeptídica quedando los enlaces peptídicos más accesibles a la enzima. La β -lg nativa es hidrolizada por papaína y no es hidrolizada por pepsina.

Lieske y Konrad (1996) estudiaron la susceptibilidad enzimática de α -la y β -lg para la hidrólisis con papaína como una función del pH. Las condiciones de trabajo fueron $\text{pH} = 3.5, 6.0$ y 8.0 ; $T = 43$ °C, $s_0 = 2.3$ % y $E/S = 1/50$. La disponibilidad enzimática de la β -lg fue mejor a $\text{pH} > 7.5$, mientras que la α -la fue hidrolizada sin limitación a pHs ácidos, donde la unión de la α -la con el

2. INTRODUCCIÓN

Ca^{+2} no tiene lugar. La unión del Ca^{+2} protegió completamente a la α -la contra la degradación proteolítica a pH = 6.0 y 8.0.

Castro *et al.* (1996) hidrolizaron proteínas de suero ácido con una preparación enzimática de *Bacillus subtilis* como un posible tratamiento para reducir su alergenicidad manteniendo su valor nutricional. Determinaron el grado de hidrólisis a diferentes pHs, temperaturas y relaciones enzima sustrato, identificando las condiciones de operación que no producían péptidos amargos (grado de hidrólisis por debajo del 12 %, pH = 4.0, T = 33 °C) y que producen una eliminación sustancial de α -la y β -lg.

Pintado *et al* (1999) realizaron la hidrólisis de proteínas séricas durante 12 h con Proteasa 2A y tripsina, usando 2 concentraciones de enzima (20 y 40 g/kg proteína). A las muestras se les realizaron los siguientes ensayos: recuento de microflora resistente a la termización, concentración total de aminoácidos libres, perfil de péptidos y grado de hidrólisis. La mayor concentración de aminoácidos libres se obtuvo con Proteasa 2A y la mayor variación en la composición cualitativa de los aminoácidos tuvo lugar entre las 2 y las 6 h. La hidrólisis con tripsina produjo la liberación de grandes cantidades de lisina. La formación de péptidos fue más extensa bajo la acción de tripsina que de Proteasa 2A y la mayoría de los péptidos liberados por la primera tenían pesos moleculares comprendidos en los rangos 7500-8000 y 4000-5000 Da, mientras que los liberados por la segunda se acumulan en el rango 7000-7500 Da. Las diferencias entre la actividad hidrolítica de ambas enzimas fue significativa excepto en lo que respecta a la concentración de glutamina, así como en la extensión de la rotura de IgG y β -lg.

2.1.6. Estudios cinéticos.

Los trabajos publicados sobre el mecanismo y la cinética de la hidrólisis enzimática de proteínas son escasos debido a dos razones: la complejidad de la reacción (rotura simultánea de enlaces de distinta reactividad, productos que son a su vez sustrato para el proceso, fenómenos de inhibición, desactivación de la enzima) y su importancia económica, que determina un mayor interés por el desarrollo y patentado de procesos comerciales.

En la hidrólisis de proteínas, un modelo cinético demasiado simple no es adecuado para representar el mecanismo real, lo que limita su aplicabilidad. Por otro lado, un modelo complejo no puede ser analizado estadísticamente con suficiente precisión. Por ello a veces se utilizan ecuaciones cinéticas empíricas que explican los resultados obtenidos y que son útiles para el diseño y optimización del reactor enzimático de hidrólisis, aunque no sugieran posibles mecanismos de reacción.

2. INTRODUCCIÓN

Boudrant y Cheftel (1976) estudiaron el proceso de hidrólisis de caseína con Alcalase a pH = 8.8 y una concentración de sustrato del 5%. A sus resultados aplicaron un modelo con cinética de primer orden.

Svendsen (1976) obtuvo curvas de Michaelis-Menten para la hidrólisis de caseína y gelatina con Subtilisina Carlsberg a pH = 8 y 30 °C, con valores de $K_M = 0.5$ % para la gelatina, y de $K_M = 0.1-0.2$ % para la caseína. El valor de K_M podía cambiar con el pH y la temperatura.

Adler-Nissen (1978 b) demostró que para la hidrólisis de proteína de soja con Alcalase a alta concentración de sustrato ($s_0 = 12$ %; $E/S = 12$ UA/kg; pH = 8; $T = 50$ °C), la cinética viene determinada por una inhibición de la enzima por sustrato a lo largo de la reacción. Ésto sugiere una cinética de orden cero, que se demostró por determinaciones de K_M . Se comprobó que el valor de K_M era dependiente del grado de hidrólisis, y que la inhibición por sustrato prevalecía a todos los grados de hidrólisis.

Constantinides y Adu-Amankwa (1980) analizaron la cinética de la hidrólisis de proteína de soja insoluble por una proteasa obtenida por fermentación de *Penicillium duponti* K 1104 en los intervalos de 55-90 °C y pH=3.4-3.7. Estos autores proponían un mecanismo de solubilización que implicaba la adsorción de la enzima a la proteína insoluble, inhibición por los péptidos de bajo peso molecular y desactivación enzimática; derivaban así unas ecuaciones cinéticas globalizadas semiempíricas de 4-5 parámetros, cuyos valores se determinan por regresión no lineal aplicando el algoritmo de Marquardt. Posteriormente, estos mismos autores inmovilizaron la enzima sobre colágeno reconstituido, lo que permitía incrementar la productividad por unidad de masa de enzima activa por un factor de 4.5.

Akuzawa *et al.* (1985) estudiaron la hidrólisis de diferentes tipos de caseína (α , β , κ) y de caseína entera con una proteinasa de *Streptococcus lactis*, siguiendo el curso de la reacción por la concentración de tirosina liberada y por electroforesis en gel de poliacrilamida. Estos autores ajustaron sus datos de velocidad inicial a una cinética de Michaelis-Menten.

Adler-Nissen (1986) apuntó la posible presencia de inhibidores de la reacción enzimática a altos grados de hidrólisis que no estarían presentes en las primeras etapas del proceso. Puede ser que a lo largo del proceso se produzcan péptidos inhibidores resultado de la transpeptidación, que da lugar a la formación de secuencias de aminoácidos no presentes en el sustrato original. Los péptidos que se van formando actúan como sustratos competitivos con la proteína original no hidrolizada, lo que explica que en la práctica sea imposible llegar al 100% de hidrólisis, con el uso exclusivo de

2. INTRODUCCIÓN

endopeptidasas. Como conclusión, el proceso puede explicarse como resultado de una competición entre el sustrato original y los péptidos que se van formando durante la hidrólisis.

Markovic *et al.* (1988) estudiaron la hidrólisis de proteínas de cebada con una Neutrased de *Bacillus subtilis* y ajustaron bien sus resultados cinéticos mediante la ecuación de Foster-Nieman correspondiente a la cinética enzimática simple con inhibición competitiva de producto:



mecanismo que conduce a la ecuación integrada de velocidad

$$\frac{1}{t} \ln \frac{s}{s_0} = - \frac{K_j - K_M}{K_M (K_j + s_0)} \frac{P}{t} + \frac{K_2 K_j e_T}{K_M (K_j + s_0)} \quad [2.6]$$

donde

$$K_M = \frac{k_{-1} - k_1}{k_1}, \quad K_j = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad [2.7]$$

La ecuación anterior ajustó bien los resultados de cada uno de sus experimentos cinéticos considerando como P la concentración de proteína solubilizada:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{s}{s_0} = K \frac{P}{t} + h \quad [2.8]$$

Sin embargo, los valores de los parámetros obtenidos no variaban de acuerdo con las concentraciones iniciales de sustrato y de enzima. Estos autores detectaron también una desnaturalización de la enzima que ajustaron a una cinética de primer orden.

Postolache y Oncescu (1989) realizaron algunos experimentos de hidrólisis de caseína y hemoglobina con Alcalase a diferentes temperaturas, si bien impusieron la ecuación de Michaelis-Menten para ajustar los datos de velocidades iniciales obtenidos por diferenciación gráfica.

Sanogo *et al.* (1990) estudiaron la influencia de la concentración de la α_{s1} -caseína sobre la actividad hidrolítica de la papaína, comprobando que una alta concentración inicial de caseína resulta inhibidora. Al mismo tiempo, analizaron la influencia que tiene sobre el proceso la fuerza iónica del

2. INTRODUCCIÓN

medio, que afecta a la conformación y agregación de la proteína, provocando el enmascaramiento o desenmascaramiento de enlaces peptídicos. Comprobaron que en presencia de cloruro de sodio o de urea, se incrementa la afinidad de la papaína por la α_{s1} -caseína y se hace más importante el efecto inhibidor del exceso de sustrato.

Tayyab y Qamar (1992) realizaron un sencillo experimento de hidrólisis de caseína con papaína, ensayando diferentes tiempos de reacción, concentraciones de enzima y concentraciones de sustrato, para analizar su influencia sobre la velocidad del proceso de hidrólisis. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten, y se linealizaron de varias formas (Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf, Woolf-Augustinsson-Hofstee, Eadie-Scatchard).

Mukataka *et al.* (1992) estudiaron coeficientes de partición en sistemas polietilenglicol/dextrano en fase acuosa para mezclas de caseína y sus componentes α , β , κ caseína. Se investigaron las velocidades de proteólisis de la caseína por α -quimotripsina y por tripsina en reactores de una sola fase y de dos fases acuosas, examinando las ventajas de la partición selectiva de sustratos, enzimas y productos. Al utilizar sistemas de dos fases acuosas, se pretendió mantener una enzima en un medio acuoso, mientras se recuperaban productos hidrofílicos en una segunda fase acuosa; de esta forma se solubilizaba la proteína que es poco soluble en agua, y se eliminaba la inhibición por productos al retirar el que se va formando. Sin embargo, también tenía inconvenientes, como por ejemplo, la presencia de polímeros solubles en agua, lo que podía complicar la purificación del producto final. Presentaron un modelo sencillo basado en la cinética de Michaelis-Menten, que comparaba el funcionamiento de reactores de dos fases acuosas con reactores homogéneos tanque agitado.

Camacho *et al.* (1993) estudiaron la hidrólisis enzimática de caseína bovina con Alcalase 0.6L a pH=8.0 y 50 °C, obteniendo una ecuación integrada de velocidad que permitió evaluar el grado de hidrólisis, x , en función de las condiciones de operación ($s_0 = 40-85.6$ g proteína/L, $e_0 = 0.15-1.5$ UA/L y tiempo de reacción) con una desviación menor del 5%. La ecuación de velocidad obtenida

$$s_0 \frac{dx}{dt} = k_h e = k_h e_0 \exp \left(- \frac{k'_d}{k_h} x \right) \quad [2.9]$$

es consistente con que la reacción de hidrólisis sea de orden cero con respecto al sustrato, y que simultáneamente se produzca una desnaturalización de segundo orden de la enzima. k_h es la constante de velocidad de la reacción de hidrólisis, e es la concentración total de enzima activa en

2. INTRODUCCIÓN

cualquier instante y k'_d es la constante de velocidad de la reacción de desnaturalización de la enzima. Esta ecuación permite optimizar los valores de s_0 , e_0 y t en función de los costes y las características de los hidrolizados a obtener.

González-Tello *et al.* (1994) investigaron la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero con proteasas comerciales de origen bacteriano y animal. La cinética de la hidrólisis se ajusta a la siguiente ecuación de velocidad:

$$s_0 \frac{dx}{dt} = k_h (e_0 - \varepsilon s_0) \exp\left(-\frac{k'_d}{k_h} x\right) \quad [2.10]$$

en los intervalos de 50-70 °C, pH=8.0-10.0 y para grados de hidrólisis de 0-22 %.

El término proporcional a la concentración inicial de sustrato que aparece restando a la concentración de enzima activa en la ecuación anterior, se ha explicado admitiendo la existencia en el sustrato de un inhibidor irreversible de serina-proteinasas, que ha sido encontrado en el lactosuero por Weber y Nielsen (1991). Este inhibidor actúa asociándose de forma irreversible a una fracción de la enzima activa en tiempos muy cortos comparados con los necesarios para la hidrólisis.

La ecuación cinética indicada anteriormente se ha explicado mediante el siguiente mecanismo:

- Un proceso muy rápido de unión irreversible de la enzima activa al inhibidor presente en el sustrato



que determina que la concentración inicial efectiva de enzima activa se reduzca a

$$e_{0a} = e_0 - \varepsilon s_0 \quad [2.12]$$

- Hidrólisis de orden cero con respecto al sustrato simultánea con desnaturalización de segundo orden por ataque de la enzima libre a la enzima ligada



2. INTRODUCCIÓN

Se han determinado los parámetros cinéticos: ϵ , k_h y k_d a pH = 8 y 50 °C para las proteasas comerciales estudiadas.

Vorob'ev *et al.* (1996) estudiaron la hidrólisis de α -caseína, β -caseína, α -la, β -lg y seroalbúmina bovina (BSA) con quimotripsina siguiendo el proceso mediante técnicas de electroforesis. La velocidad de la hidrólisis de las caseínas era dos órdenes mayor que la de las proteínas del suero.

Margot *et al.* (1997) propusieron modelos empíricos para describir la hidrólisis enzimática de las proteínas del suero con tripsina a pH = 7.3. Admitieron inhibición por sustrato y desactivación de la enzima por autohidrólisis y desdoblamiento térmico. Siguió la reacción por la fracción de nitrógeno soluble (nitrógeno no proteínico, NPN). Bajo condiciones de inactivación moderada de la enzima ($T < 60$ °C), puede utilizarse un modelo de dos parámetros basado en una cinética con decrecimiento exponencial de la actividad al aumentar NPN:

$$\frac{dNPN}{dt} = \frac{a_1 a_2}{(a_2 + t)^2} + a_3 \quad [2.16]$$

o el siguiente, también de dos parámetros, que explica bien los datos a 55 °C pero no a 60 °C, y que es aplicable para sistemas de reacción con fuerte inhibición por producto y bajas velocidades de desactivación catalítica:

$$\frac{dNPN}{dt} = a_1 \frac{e_0}{s_0^2} \exp(-a_2 NPN) \quad [2.17]$$

A temperaturas en las que hay una fuerte inactivación de la enzima, se requieren modelos como el siguiente, de cuatro o más parámetros:

$$\frac{dNPN}{dt} = a_1 a_2 \exp(-a_2 t) + a_3 a_4 \exp(-a_4 t) \quad [2.18]$$

Madsen y Qvist (1997) evaluaron la acción de una serina proteasa de *Bacillus licheniformis* (BLP), que rompe preferentemente enlaces peptídicos en el sitio carboxílico de Glu-X y Asp-X, con proteínas de leche como sustrato (caseína y WPC). Las mejores condiciones de trabajo fueron pH = 10, 60 °C para la caseína y 70 °C para el WPC. Se determinaron las constantes cinéticas de la ecuación de Michaelis-Menten y la energía de activación, y de los valores obtenidos se dedujo que la enzima hidroliza la caseína mucho más eficientemente que las proteínas del suero, lo que se debe a la estructura globular de las proteínas del WPC, que protege los enlaces peptídicos frente a la hidrólisis.

Camacho *et al.* (1998) estudiaron la influencia de la mezcla de proteasas de distinto origen, del pH y de la temperatura sobre la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero. Todos los resultados obtenidos fueron reproducibles con el modelo cinético que estos autores propusieron en un trabajo anterior ya citado (González-Tello *et al.*, 1994).

Se comprobó que la velocidad global del proceso de hidrólisis de las proteínas del lactosuero se incrementaba al aumentar el pH y que la temperatura óptima era aproximadamente 60 °C.

En los experimentos llevados a cabo con mezclas de enzimas, se observaron dos fenómenos contrapuestos: un efecto sinérgico entre las dos proteasas que aumenta la velocidad global de hidrólisis, y un proceso de pérdida de la actividad enzimática que puede ser debida a un ataque mutuo entre ambas enzimas. A partir de una conversión del 10 % predomina el efecto sinérgico.

2.2. Producción de hidrolizados.

La hidrólisis de proteínas es una tecnología antigua usada desde hace siglos en todo el mundo. Como ya se ha dicho anteriormente, actualmente los procesos de hidrólisis han conducido al desarrollo de proteínas modificadas usadas para mejorar las propiedades funcionales y la palatabilidad de diferentes productos alimentarios, como suplemento nutricional en fórmulas infantiles y como producto farmacéutico para pacientes que por diversas razones no pueden consumir proteína nativa.

Las técnicas usadas en el pasado para fabricar estos productos incluían reacciones químicas ácidas o básicas en discontinuo. Sin embargo, este tipo de reacciones daban lugar a pérdida de propiedades funcionales y reducción del valor nutricional, creaban riesgos para la salud debido a los reactivos usados y su interacción con el sustrato, y tenían poca reproducibilidad.

La modificación enzimática de proteínas es actualmente el método más utilizado debido a las condiciones moderadas del proceso y a la posibilidad de controlar las propiedades funcionales del producto a través de la selección de la enzima proteolítica específica. Sin embargo, los costes implicados en las reacciones discontinuas son altos debido a la cantidad de enzima requerida, el coste energético y de mano de obra, el espacio y el equipamiento necesario. La reacción discontinua típica implica la mezcla de enzima y sustrato en un gran tanque y mantener la temperatura y el pH constantes durante varias horas. Una vez es alcanzado el grado de hidrólisis requerido, la reacción se concluye mediante un cambio en el pH o un aumento de la temperatura para inactivar la enzima. Por tanto la enzima es usada sólo una vez. Además, el proceso discontinuo es lento, la conversión de sustrato es baja y las propiedades del producto varían entre lotes.

2. INTRODUCCIÓN

La inmovilización de enzimas en un soporte sólido ha sido una de las técnicas usadas para solventar estas desventajas. Este método ha promovido el desarrollo de procesos de hidrólisis continuos, reduciendo el coste de enzima y mejorando el control del proceso y la consistencia de las propiedades funcionales. Sin embargo, este método tiene limitaciones como el alto coste de inmovilización de la enzima, pérdida de actividad enzimática debido a impedimentos estéricos y restricciones en la difusión, especialmente con macromoléculas y suspensiones coloidales. El frecuente atasco de los reactores de lecho fijo utilizados ha sido también un problema.

El desarrollo de la tecnología de membranas ha conducido a un nuevo concepto: reacción continua y separación simultánea del producto de la mezcla reaccionante. Un módulo de membrana con el tamaño de poro y las características fisicoquímicas apropiadas se incorpora al reactor que contiene la enzima. El alimento es continuamente bombeado a la mezcla de reacción mientras que el producto es constantemente retirado en el permeado. El tamaño molecular del producto puede ser controlado mediante la selección de la membrana con el tamaño de poro adecuado. La enzima es reciclada y reutilizada, mejorando por tanto la utilización de la enzima y la productividad global.

2.2.1. Reactores para hidrólisis de proteínas.

El método más común, usado en el pasado y en el presente, para la producción de hidrolizados de proteínas es el reactor discontinuo agitado.

Hay que mencionar que ha habido algunos intentos de usar enzimas inmovilizadas para el desarrollo de procesos continuos de hidrólisis y que simultáneamente al desarrollo de la tecnología de ultrafiltración por membranas, han surgido dos nuevos tipos de reactores continuos: el reactor enzimático de fibra hueca de flujo pistón y el reactor continuo agitado de membrana.

A continuación se analizarán brevemente los diversos tipos de reactores utilizados en la práctica.

2.2.1.1. Reactores enzimáticos discontinuos.

La hidrólisis de proteínas en reactores discontinuos implica (Cheryan and Deeslie, 1980):

- Alto coste asociado al uso de grandes cantidades de enzima. En el proceso discontinuo, el sustrato y la enzima son mezclados en una suspensión que se mantiene a temperatura y pH óptimos durante varias horas. Después de alcanzar el deseado grado de hidrólisis, la enzima es inactivada cambiando el pH o aumentando la temperatura (Adler-Nissen, 1976). Por tanto la enzima no puede ser recuperada.

2. INTRODUCCIÓN

- Los procesos discontinuos requieren un alto coste energético y de mano de obra. Además el equipamiento usado necesita una gran superficie de implantación.
- Los procesos discontinuos son lentos y raramente llegan a una conversión óptima debido a inhibición por producto, lo cual conduce a bajos rendimientos y productividad (Prendergast, 1974).
- Las propiedades funcionales del producto final son difíciles de controlar; el producto no es uniforme y puede contener componentes de peso molecular variable. Además, la hidrólisis descontrolada o excesiva puede generar malos sabores y amargor. El amargor se pronuncia cuando se producen péptidos hidrofóbicos de bajo peso molecular, especialmente con proteínas de soja y caseína (Adler-Nissen, 1976).

No obstante, también presentan una serie de ventajas como son:

- Simplicidad de diseño y operación.
- No es necesario un equipamiento de control costoso.
- Flexibilidad de la operación.
- Es posible manejar grandes cantidades de sustrato insoluble a altas concentraciones.

2.2.1.2. Reactores de enzimas inmovilizadas.

Una forma de solventar las desventajas del reactor discontinuo mencionadas anteriormente ha sido la inmovilización de enzimas mediante la fijación química o física a una superficie sólida, o la confinación física de la enzima en un soporte de manera que se retienen sus propiedades catalíticas (Cheryan y Mehaia, 1986).

Las principales ventajas de esta técnica incluyen:

- El desarrollo de la operación continua mediante la inmovilización de la enzima en un soporte membranario y alimentación continua de sustrato al reactor.
- Las enzimas inmovilizadas pueden ser reutilizadas un número de veces, reduciendo los costes de operación totales implicados en los procesos a gran escala.

Sin embargo, hay varios problemas relacionados con el uso de enzimas inmovilizadas:

- Pérdidas de actividad entre un 10 – 90 % (dependiendo del método de inmovilización y enzima usada) debido a fenómenos de restricción difusional, principalmente con sustratos coloidales y de alto peso molecular.

2. INTRODUCCIÓN

- El procedimiento de inmovilización y el material soporte son caros (especialmente para operaciones a pequeña escala, por ejemplo, productos farmacéuticos). Los costes de inmovilización incluyen el material soporte y el proceso de fijación de la enzima. Si el soporte puede ser usado repetidamente, como en soportes inorgánicos porosos, el coste por soporte se vuelve menos crucial (Sweigart, 1978).

Se han realizado diversos estudios sobre la hidrólisis continua de proteínas lácteas a través de enzimas inmovilizadas:

Cheryan *et al.* (1975) usaron pepsina, quimosina, quimotripsina y proteasas de *Mucor miehei*, inmovilizadas en vidrio poroso alquilamino e incorporado a un reactor de lecho fluidizado para coagular continuamente leche desnatada. Encontraron que la difusión y la mezcla del catalizador eran los factores significativos a tener en cuenta en la cinética.

Reimerdes (1978) usó tripsina inmovilizada sobre lechos acrílicos para hidrolizar β -caseína. Aunque la cinética enzimática viene afectada por la hidratación estérica, se alcanza buena actividad con sustratos de pequeño peso molecular, aunque la β -caseína pura reduce la actividad significativamente.

Mehaia y Cheryan (1983) usaron quimosina y pepsina inmovilizadas en lechos de vidrio para hidrolizar micelas de caseína bovina.

Lasch *et al.* (1987) hidrolizaron varias proteínas (caseína, α -lactoalbúmina, seroalbúmina humana y una mezcla de proteínas séricas) mediante pronasa inmovilizada, termitasa y leucina aminopeptidasa en cinco tipos de reactores continuos de enzimas inmovilizadas. Encontraron baja difusión por los poros, bajos coeficientes de transferencia de materia externa y efectos de exclusión por tamaños del soporte proporcional al peso molecular del sustrato y los péptidos.

Haque y Mozaffar (1992), estudiaron en el laboratorio la posibilidad de trabajar con enzimas proteolíticas inmovilizadas sobre soportes adecuados para hidrolizar caseína de forma continua. Las enzimas usadas fueron papaína, tripsina, quimotripsina, pancreatina, rhozyme 41, quimosina, plasmína y pronasa E, y se inmovilizaron sobre PEI-silica o unidas a glutaraldehído. Algunas de ellas, una vez inmovilizadas, fueron estables en un reactor tanque agitado. La hidrólisis continua de la caseína se hizo a 37 °C, pH = 8 y $s_0 = 0.5$ %. Los péptidos obtenidos fueron diferentes según la enzima usada. Una ventaja del reactor continuo mezcla perfecta fue que permitió controlar el tamaño de los péptidos hidrolizados variando el tiempo de residencia, y por tanto obtener hidrolizados de tamaños moleculares medios diferentes, que pueden tener aplicaciones diversas.

2.2.1.3. Reactores de membrana.

Esta configuración, que utiliza la diferencia de peso molecular entre la enzima y el producto, solventa muchos de los problemas del proceso discontinuo y de la técnica de enzimas inmovilizadas e implica el uso de la tecnología de membranas. La enzima, en forma soluble, queda retenida a un lado de la membrana, donde es puesta en contacto con el sustrato, mientras que el producto debe ser lo suficientemente pequeño para permear a través de la membrana.

Los biorreactores de membrana se clasifican normalmente de acuerdo a las condiciones de mezcla y del método de retención de la enzima, así tenemos:

- Reactores de flujo pistón o de fibra hueca, donde el biocatalizador es inmovilizado o atrapado en un lado de la membrana, normalmente el lado de la carcasa.
- Reactores continuos de membrana agitados, donde el biocatalizador y el sustrato se encuentran mezclados en el recipiente de reacción y el producto se recoge a través de la membrana. Este tipo de biorreactor puede convertir sustratos de alto peso molecular (como carbohidratos y proteínas).

Esta clasificación puede ser subdividida a su vez en los sistemas de celda o de recirculación.

En la configuración en celda, la celda se carga con la enzima y el sustrato es continuamente alimentado bajo presión mientras que el permeado es continuamente retirado a través de la membrana. La agitación, para eliminar concentración por polarización, es suministrada mediante agitación magnética.

El reactor continuo de membrana agitado se diferencia del de celda en el hecho de que el módulo de membrana está físicamente separado del recipiente de reacción. Un reactor de este tipo está acoplado en un lazo semicerrado mediante una bomba con el módulo de ultrafiltración. El contenido del recipiente de reacción es continuamente bombeado a través de la membrana y reciclado al recipiente. El corte molecular de la membrana debe ser lo suficientemente bajo para retener la enzima pero lo suficientemente grande para permitir al producto permear a través de los poros y salir del sistema. El volumen total del sistema se mantiene constante igualando el caudal de entrada de sustrato con el flujo de permeado. Puesto que la mayoría de las enzimas están en el rango entre 10 y 100 kDa, se usan membranas de estos cortes de peso molecular.

Las mayores ventajas en el uso de este reactor son:

2. INTRODUCCIÓN

- Permite el uso de enzimas solubles en contacto total con el sustrato, evitando problemas típicos de los reactores de enzimas inmovilizadas como pérdida de actividad y problemas de difusión.
- Facilita el control sobre el peso molecular del producto mediante la elección de la membrana con un corte adecuado.
- Alta conversión de sustrato, atribuida a la continua retirada de productos terminales inhibidores
- Flexibilidad operacional debida a la separación entre el recipiente de reacción y la membrana
- El sistema puede ser a menudo modelado como un reactor continuo mezcla completa. Así la concentración del producto a la salida del reactor será igual a la concentración de producto en el reactor.
- Alta productividad y capacidad debido a la operación continua y a la reutilización de la enzima.

Sin embargo, el reactor de membrana tiene las siguientes limitaciones:

- Pérdida de actividad enzimática debido a inactivación térmica, autodigestión, fuga de enzima y efectos de cizalladura debido a altos caudales de recirculación de la mezcla de reacción (Deeslie y Cheryan, 1982).
- Reducción del flujo de permeado debido a concentración por polarización o a colmatación de la membrana.

A continuación se resumen los principales trabajos realizados en reactores de membrana para la hidrólisis de proteínas lácteas.

Boudrant y Cheftel (1976) estudiaron la proteólisis continua de caseína en una celda discontinua agitada. Para su estudio usaron Alcalase y una membrana Amicon de corte 30 kDa. Para reducir la pérdida de actividad enzimática durante la operación, la enzima fue químicamente estabilizada usando glutaraldehído. La Alcalase estabilizada pudo ser reutilizada durante 7 días a 40 °C para alcanzar un 75 % de conversión en sustrato. La reacción no sigue exactamente una cinética de primer orden con respecto a la concentración de sustrato y es inhibida por los productos de reacción.

2. INTRODUCCIÓN

Deeslie y Cheryan (1981 a,b; 1982) desarrollaron un proceso para la hidrólisis continua de proteínas en un reactor de membrana. Usaron un aislado de proteína de soja (Promine-D) para estudiar la cinética y el efecto de los parámetros de operación (flujo, volumen de reacción, concentraciones de enzima y sustrato) en la salida de producto y en la conversión. Se obtuvo una conversión del 91 % y se identificaron al menos cuatro fracciones de péptidos de peso molecular 2500 o menor (Deeslie y Cheryan, 1988). La actividad del reactor bajó del 91 % al 60 % en un período de 10 horas. La caída de la enzima (Pronase) fue atribuida a la fuga de pequeñas fracciones activas a través de la membrana.

Bressolier et al. (1988) estudiaron el efecto de las variables de operación: volumen del reactor, flujo de permeado, concentraciones de enzima y sustrato, sobre la capacidad y la conversión de un reactor de membrana para la hidrólisis con Alcalase de proteínas del plasma bovino. La correlación del modelo obtenido demuestra que las características del reactor de ultrafiltración están cercanas a las de un reactor continuo mezcla perfecta.

Maubois (1988) usó pancreatina para hidrolizar en continuo concentrados de proteínas séricas (7 al 9 %) a 40 °C en un reactor continuo de membrana con un corte de 5000 Da.

Mannheim y Cheryan (1990) hidrolizaron caseína con Alcalase en un reactor de membrana usando un módulo de fibra hueca. El diseño de los experimentos se encaminó a optimizar las variables de operación. Después de 1 hora a 50 °C y pH = 8 se alcanzó una conversión superior al 90 %. Mientras que la actividad del reactor dependía sobre todo de la relación E/S, la estabilidad venía dada en función de la fuga de enzima a través de la membrana, de la inactivación térmica y de las interacciones enzima-membrana.

Chiang et al. (1995) produjeron en continuo un hidrolizado de caseína bovina con Proteasa Tipo XXIII procedente de *Aspergillus oryzae* en un reactor de membrana a escala piloto. Después de 45 min a 37 °C y pH = 7 se alcanza un porcentaje de nitrógeno soluble en el hidrolizado superior al 99 %. El producto es completamente soluble en el rango de pH 2–9. La caseína inmunológicamente activa se reduce en el producto en un 99 %. El reactor puede ser mantenido en funcionamiento estacionario unas 17 horas.

Perea y Ugalde (1996) desarrollaron un proceso de hidrólisis de proteínas del lactosuero en un reactor de membrana con recirculación, en presencia de Alcalase 0.6L, variando la relación enzima-sustrato (2.5-22 %) y el tiempo de residencia (18-180 minutos), que son los dos parámetros más determinantes del proceso. Si crece E/S, aumenta la velocidad del proceso, pero suben los costes y el proceso se hace inviable en la industria, por lo que se elige un valor del 10 %; si crece el tiempo

2. INTRODUCCIÓN

de residencia, aumenta la conversión, pero tarda más en alcanzarse el estado estacionario, y los productos acumulados en la mezcla de reacción ejercen inhibición, por lo que se toma un tiempo de residencia de 182 minutos. La recirculación de la enzima y la retirada de los péptidos producidos mejora mucho el rendimiento y la productividad del proceso con respecto al proceso discontinuo llevado a cabo en las mismas condiciones. No obstante, a las siete horas el proceso se hace inviable debido a la colmatación de la membrana y a la inactivación de la enzima. El sustrato usado es WPC al 35 % en peso, diluido en agua. Como módulo de ultrafiltración se utiliza una unidad de fibra hueca de tamaño de poro de 10 kDa. Las condiciones de reacción son $\text{pH} = 8.5$ y $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$. El proceso se desarrolla en continuo, y tras cada experimento hay que regenerar la membrana de ultrafiltración. Finalmente, se obtiene un hidrolizado con un contenido del 72 % en péptidos de tamaño inferior a 1 kDa, con propiedades funcionales y nutricionales aplicables en un futuro a escala industrial.

Dado que los reactores de membrana son la alternativa más viable para realizar la hidrólisis de biopolímeros, se entrará en más detalle en aspectos relativos a las propias membranas o al diseño del reactor.

Separación por membranas.

La tecnología de membranas tiene en el presente un alto impacto industrial, con un mercado en constante crecimiento. Se aplica a un amplio rango de procesos de separación debido a que ofrece ventajas respecto a los métodos convencionales, tales como reducción de costes, mayor selectividad y menor aparición de productos no deseados (puesto que no se requieren aditivos), mayor simplicidad, posibilidad de llevar a cabo la operación en continuo, menor consumo de energía (ya que no hay un cambio de fase asociado al proceso), facilidad de combinación con otros procesos, posibilidad de efectuar la operación en condiciones no severas y fácil escalado.

Clasificación de los procesos

Los procesos de membrana en los que la fuerza impulsora es la presión se clasifican generalmente en 4 categorías, basándose en las partículas o moléculas separadas y, por tanto, en el tamaño de los poros de la membrana:

- Microfiltración (0.05-10 μm , 0.5-3 bar)
- Ultrafiltración (0.1-0.001 μm , 1-10 bar)
- Nanofiltración (0.005-0.0005 μm , 5-30 bar)

2. INTRODUCCIÓN

- Ósmosis inversa (<0.0005 μm , 10-50 bar).

Al disminuir el tamaño de los poros, la resistencia de la membrana a la transferencia de materia aumenta y la presión aplicada ha de ser mayor.

La microfiltración (MF) se emplea para separar partículas en el rango de 0.05 a 10 μm utilizando membranas porosas. La mayoría de las membranas de MF están fabricadas con materiales poliméricos (PE, PP, teflón, etc), pero los materiales inorgánicos son también ampliamente utilizados: alúmina, zirconio, titanio, carbono y varios metales (acero, estaño, níquel, etc.). Mediante MF pueden retenerse sólidos suspendidos y puede usarse en clarificación, esterilización y concentración. Algunas aplicaciones importantes son: esterilización en frío de bebidas y productos farmacéuticos, clarificación de zumo de frutas, vino y cerveza, recuperación de células, purificación de agua en la industria de semiconductores, recuperación de metales como óxidos o hidróxidos coloidales, tratamiento de aguas residuales y de superficie y separación de emulsiones aceite-agua.

En la ultrafiltración (UF) se retienen moléculas relativamente grandes, de entre 2 y 100 nm (proteínas, polímeros o partículas coloidales y emulsiones). Las moléculas pequeñas como sales y disolventes o solutos de bajo peso molecular pueden pasar libremente a través de la membrana. Al igual que en MF, las membranas de UF pueden estar fabricadas tanto de polímeros como de materiales inorgánicos. La UF tiene muchas aplicaciones como etapa de concentración y purificación en la industria láctea (leche, lactosuero, queso) y alimentaria (almidón, proteínas), así como en metalurgia, industria textil (recuperación de tintes) y del automóvil (recuperación de pintura) y tratamiento de aguas residuales.

La nanofiltración (NF) es un proceso de membrana intermedio entre la ultrafiltración y la ósmosis inversa, empleado para retener moléculas orgánicas de bajo peso molecular (200-1000 Da) e iones multivalentes (Ca^{2+}). La presión aplicada es relativamente baja, comparada con la ósmosis inversa (en el rango de 3 a 20 bar). Las membranas de nanofiltración son principalmente membranas compuestas, más parecidas a las de ósmosis inversa que a las de ultrafiltración. Las principales aplicaciones de este proceso son la separación de pequeñas moléculas, tales como proteínas, enzimas, antibióticos, tintes, herbicidas, pesticidas e insecticidas, eliminación de la dureza del agua y tratamiento de aguas residuales.

La ósmosis inversa (RO) permite retener moléculas de bajo peso molecular, tales como las sales. La retención de disolventes orgánicos generalmente no es alta debido a que se disuelven en la membrana. La resistencia de ésta es mayor que en la nanofiltración, lo que implica que el flujo, para una presión determinada, es siempre menor. Se utilizan membranas tanto asimétricas como

2. INTRODUCCIÓN

compuestas, siendo los materiales más comunes triacetato de celulosa, poliamidas aromáticas y polibenzimidazoles. Mediante ósmosis inversa se consigue la desalinización de agua del mar, producción de agua ultrapura y concentración de zumos, azúcares y leche.

Estructura química de las membranas.

Desde el punto de vista de la estructura, se pueden distinguir diversos tipos de membranas: homogéneas, asimétricas, compuestas y de fibra hueca. Las membranas homogéneas se encuentran poco desarrolladas puesto que presentan una permeabilidad relativamente débil.

Las membranas asimétricas, denominadas también anisotrópicas, están constituidas por dos capas superpuestas: una subcapa de 100 a 200 μm de espesor, de estructura relativamente porosa (permite un elevado flujo de solvente), que sirve de soporte a la membrana activa propiamente dicha, una película muy fina de 0.1 a 1.5 μm de espesor. Las propiedades de separación de estas membranas (permeabilidad, selectividad) dependen exclusivamente de las propiedades de esta película.

Las membranas compuestas fueron desarrolladas con el fin de aumentar la permeabilidad de las membranas asimétricas clásicas mediante una disminución del espesor de la capa activa. Se elaboran depositando una delgada película semipermeable de 10 a 100 nm sobre un soporte poroso de polisulfonas u otros polímeros. Entre el soporte y la capa activa se sitúa una capa mesoporosa que actúa de unión entre capas y aporta estabilidad al conjunto. El soporte macroporoso y la capa activa están formados de materiales diferentes, de ahí el nombre de “compuestas”.

Las membranas de fibra hueca están constituidas por tubos huecos que tienen un diámetro exterior comprendido entre 50 y 1000 μm y un diámetro interior entre 25 y 800 μm . Se obtienen mediante procesos de hilado análogos a los utilizados en la industria textil. Su estructura es generalmente asimétrica, con la capa activa situada bien en el exterior o en el interior de la fibra.

En cuanto a los métodos de fabricación de membranas, los principales son: separación o inversión de fases para las membranas orgánicas de microfiltración o ultrafiltración; polimerización interfacial para las membranas orgánicas de nanofiltración y ósmosis inversa y sinterización para las membranas minerales de microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración.

Las membranas porosas de filtración pueden ser de naturaleza orgánica (80-90 % de la superficie instalada) o mineral. No obstante, en función de las normas higiénicas exigidas en las industrias agroalimentarias, las membranas minerales tienen una gran importancia puesto que toleran condiciones extremas de limpieza y esterilización.

2. INTRODUCCIÓN

Las primeras membranas orgánicas fueron las de acetato de celulosa, en las que el material de base es la celulosa de la cual se reemplazan uno o varios grupos hidroxilo por grupos acetilo. Su fabricación es fácil y barata y ofrece baja adsorción de proteínas, por lo tanto tendencia al colmatado inferior a otros polímeros. Sin embargo, este tipo de polímero actualmente está en desuso puesto que presenta sensibilidad a la temperatura, pH y cloro, que dificulta el trabajo a temperaturas elevadas sobre todo durante los procesos de limpieza. Igualmente, son sensibles a la compactación por efecto de la presión aplicada, lo cual disminuye la permeabilidad y modifica la selectividad, y a la degradación por parte de microorganismos.

Las membranas de poliamidas fueron desarrolladas para las aplicaciones de ósmosis inversa y nanofiltración, teniendo en cuenta los inconvenientes del acetato de celulosa. Este material tiene mayor resistencia a temperaturas elevadas, mejor estabilidad química, mayor tolerancia a pH extremos y una resistencia mecánica superior. No obstante, tiene gran sensibilidad a los oxidantes, en concreto al cloro, permeabilidad reducida y presenta problemas de adsorción, en particular de proteínas, debido a su carácter menos hidrófilo que el acetato de celulosa.

Las primeras membranas de polisulfonas aparecieron a mediados de los años setenta. Se caracterizan por tener un grupo $-SO_2-$ relativamente estable. La carga de la membrana va a depender de pH de la solución en contacto con ella. Actualmente alcanzan una gran difusión en el mercado, ya sea formando la capa activa o como base de los componentes macroporosos. Ofrecen una buena estabilidad térmica, correcta resistencia a los pH extremos (1-13), lo cual tiene un gran interés desde el punto de vista de la limpieza, y buena resistencia a concentraciones de cloro relativamente elevadas (5-200 mg/L) según el periodo de exposición. Aunque las evoluciones habidas en los últimos años han mejorado esta característica, tienen cierta sensibilidad al compactado, generalmente no soportan presiones superiores a 25 bar.

Los principales polímeros acrílicos utilizados en la fabricación de membranas son el ácido acrílico y el poliacrilonitrilo, ya sean bien solos, asociados (ácido acrílico sobre poliamidas o polialcoholes) o formando copolímeros. Ofrecen buena estabilidad térmica y química y la posibilidad de almacenado en seco. Por el contrario, su resistencia mecánica es limitada y se encuentra dificultad para obtener pequeños diámetros de poro.

Los polímeros fluorados se emplean exclusivamente en microfiltración, siendo los más comunes el PVDF y el PTFE, ya sea de forma aislada, formando uniones con otros polímeros o en forma de copolímeros unidos. Su resistencia térmica y estabilidad química son excelentes, aunque la

2. INTRODUCCIÓN

permeabilidad es reducida, debido al carácter hidrófobo de la membrana y es difícil obtener pequeños diámetros de poro.

Las membranas minerales son conocidas como las membranas de tercera generación por ser las más avanzadas del mercado. Las de soporte de carbono están constituidas por tubos de carbono poroso de 6 mm de diámetro interior, 2 mm de espesor y 1200 mm de longitud. El interior del tubo está recubierto de una capa fina de óxido de zirconio de 10 a 20 μm de espesor. Estas membranas son susceptibles de separar moléculas con una masa molar de 20000 o más hasta partículas de 0.1 μm .

Las membranas minerales compuestas de alúmina han surgido de la investigación realizada en la industria nuclear. En el mercado se encuentran fundamentalmente bajo la geometría tubular y de monolito o multicanal., es decir, se trata de un bloque cerámico atravesado en toda su longitud por varios canales. El soporte suele estar realizado en alúmina α con un diámetro de poro de 12 μm . Las capas activas con un espesor de 20 μm pueden tener diferente naturaleza (alúmina α , alúmina γ , óxido de zirconio), según el diámetro de poro deseado.

Con las membranas minerales se puede trabajar a pHs comprendidos entre 0 y 14 y a presiones de 20 bar. Además soportan temperaturas de esterilización. Sin embargo, su precio es muy elevado y el volumen muerto es muy importante (1.5 L/m²) debido a su configuración tubular.

Configuraciones de membrana

Para sus aplicaciones industriales las membranas deben montarse sobre unos determinados soportes denominados módulos. Los parámetros que permiten comparar los diferentes tipos de configuraciones son el tipo de régimen de flujo, la compacidad (relación entre superficie filtrante con respecto al volumen del equipo), la facilidad de desmontado y sustitución de membranas defectuosas, la facilidad de limpieza y el volumen muerto del equipo.

La elección del tipo de módulo depende de diferentes criterios. El aspecto sanitario es esencial para todas las aplicaciones agroalimentarias. Para satisfacer la legislación, la concepción del módulo de filtración debe evitar la existencia de zonas muertas, susceptibles de colmatarse y de favorecer el desarrollo bacteriano. Es igualmente importante que el módulo sea fácilmente limpiable y en ciertos casos esterilizable con vapor. Los materiales utilizados en el módulo deben estar autorizados para el contacto con alimentos. El módulo industrial debe responder a las exigencias del proceso global desde el punto de vista cualitativo. La filtración debe ser selectiva desde el punto de vista del producto. Las condiciones de trabajo propuestas no deben alterar la calidad del producto. Por otro lado, el módulo y la membrana deben poder trabajar en las condiciones de trabajo del proceso

2. INTRODUCCIÓN

(viscosidad, temperatura, presencia de partículas abrasivas, pH, resistencia a productos de limpieza).

La comparación desde el punto de vista económico es compleja. El estudio debe reflejar el coste de filtración por unidad de masa de producto filtrado. Este coste está determinado por la inversión inicial, el mantenimiento y reemplazamiento de membranas, la limpieza y el coste energético del tratamiento. El coste de instalación depende fuertemente de la superficie filtrante instalada y de la superficie de cada módulo industrial de filtración. Los módulos con grandes superficies filtrantes permiten simplificar de manera muy importante el montaje. Pero hoy en día el coste de la parte de automatización está tomando una gran importancia, sin olvidarse por supuesto de la gestión de fluidos (tanques, bombas, etc.). En cuanto al coste de funcionamiento, la partida más importante corresponde al consumo energético por unidad de volumen de permeado producido. El colmatado de la membrana disminuye el flujo de filtrado y aumenta por lo tanto el consumo energético por unidad de volumen de permeado. Por esta razón es muy importante que la membrana se limpie bien y que la frecuencia de las limpiezas no sea muy elevada, no solamente por las paradas de producción, sino también por la duración de vida de las membranas.

Las membranas se pueden disponer en diferentes configuraciones: tubulares, fibra hueca, plana y espiral. Los módulos tubulares están constituidos por tubos porosos sobre los cuales está fijada la membrana. El diámetro del tubo resulta de un compromiso entre el consumo de energía (que disminuye con el diámetro) y el coste de fabricación (que aumenta con el diámetro). Al tratarse de tubos con diámetros relativamente importantes, los módulos tubulares pueden aceptar fluidos relativamente cargados de partículas y ofrecen sencillez en la instalación, limpieza y reemplazamiento de las membranas. Estos módulos tienen baja compacidad, con la relación superficie de intercambio/unidad de volumen más reducida de todas las geometrías existentes (entre 10 y 300 m² por m³) y un elevado volumen muerto.

Los módulos de fibra hueca pueden ser considerados como módulos tubulares compuestos de tubos de pequeño diámetro. La diferencia con los módulos tubulares es que éstos están constituidos por una membrana activa y un soporte inerte, mientras que las fibras huecas juegan a la vez el papel de soporte y de membrana. Poseen alta compacidad, con la relación superficie de intercambio/unidad de volumen más elevada (entre 1000 y 10000 m² por m³) y un volumen muerto reducido. El consumo energético es bajo, ya que el régimen de circulación es laminar. Existe la posibilidad de limpieza en contracorriente. La sensibilidad al colmatado es elevada, debido al reducido diámetro

2. INTRODUCCIÓN

de las fibras, por lo que es necesario realizar pretratamientos relativamente exhaustivos y se encuentra dificultad para el tratamiento de productos viscosos.

La configuración en módulos planos es la más simple y la más antigua. Se puede presentar en forma de placas unitarias o en forma de cartucho. Uno de los parámetros importantes es la distancia entre membranas. Una distancia reducida hace necesaria la prefiltración, dificulta la limpieza e impide el tratamiento de productos viscosos. Por otra parte una distancia elevada implica un volumen muerto importante, aunque disminuye la energía necesaria para el bombeo. Este sistema es muy modular, pudiendo ser modificado de manera relativamente sencilla, con gran facilidad para el recambio de membranas. No obstante, el sistema es poco compacto (de 100 a 400 m² por m³) y requiere una inversión relativamente elevada.

En los módulos de configuración espiral, las membranas planas son enrolladas alrededor de un tubo perforado y hueco destinado a conducir el permeado. Entre las membranas se instala una rejilla plástica de espesor variable, que tiene la función separar las membranas y, al mismo tiempo, crear una turbulencia en la vena del fluido. Para poder ejercer la presión necesaria al procesado, los rulos de membrana (denominados cartuchos) son insertados en cuerpos de presión tubulares con un sistema de juntas en los extremos. En general en un tubo de presión se instalan varios cartuchos. El sistema es modular, pudiendo ser adaptado a las necesidades de la industria con relativa facilidad. La compactidad es elevada (de 300 a 1000 m² por m³), el coste de inversión es relativamente reducido y el consumo energético es bajo. Por el contrario, presenta baja adaptabilidad a productos viscosos, con flujos reducidos. Las pérdidas de carga y la colmatación son elevadas y aparecen zonas muertas.

Diseño del reactor de membrana.

Cheryan y Deeslie (1980) dan una lista de puntos a tener en cuenta en el diseño de un reactor de membrana:

- Los parámetros cinéticos obtenidos de un reactor discontinuo, si bien son adecuados para predicciones en el reactor de membrana, se correlacionan pobremente con la cinética de operación del reactor.
- A pesar de la pérdida de actividad de la enzima, la alta conversión de sustrato (medida como concentración de producto en el permeado dividida entre concentración de sustrato en la alimentación) puede ser mantenida durante largos periodos de tiempo ajustando la relación

2. INTRODUCCIÓN

enzima/sustrato y el tiempo de residencia (definido como el volumen de la mezcla de reacción entre el flujo de permeado).

- La caída del flujo puede ser minimizada controlando la concentración por polarización y la colmatación de la membrana, es decir, manteniendo altos caudales de recirculación.
- La separación física del recipiente de reacción de la unidad de ultrafiltración es necesaria y permite un mejor control de los parámetros de reacción (temperatura, pH, concentración de sustrato, mezcla).
- Selección cuidadosa de las características de la enzima. La enzima debe tener alta actividad, estabilidad térmica y amplia especificidad. Estas características son importantes para conseguir alta productividad, estabilidad operacional para largos periodos y altos rendimientos en producto, lo cual puede requerir el uso de la relación adecuada de endo y exopeptidasas.
- El módulo de membrana de ultrafiltración debe tener una alta relación área/volumen, bajo volumen muerto y un alto flujo para presiones transmembrana bajas.

Los parámetros importantes de diseño para el reactor de membrana son: tiempo de residencia (a veces denominado tiempo espacial), concentración de sustrato de entrada, actividad o concentración de enzima, temperatura y pH de la mezcla de reacción y relación enzima/sustrato (Adler Nissen, 1986). El tiempo de residencia del reactor es definido como el tiempo requerido para procesar un volumen de reactor de sustrato, medido en condiciones específicas. Otros parámetros importantes incluyen la distribución de tiempos de residencia de elementos en el volumen del reactor y la capacidad del reactor, que describe la relación entre la concentración de producto y la concentración de enzima por unidad de tiempo. Todos los parámetros mencionados afectan a la productividad del reactor, expresada en unidades de masa de hidrolizado por unidad de volumen de reacción y tiempo.

La ecuación de Michaelis-Menten ha sido usada para derivar ecuaciones cinéticas que describen la actuación de los reactores enzimáticos (Deeslie, 1980). Esta ecuación es integrada con respecto al tiempo y combinada con un balance másico de sustrato. Se usa para describir la relación entre conversión de sustrato y los parámetros del reactor (relación enzima/sustrato, actividad de la enzima, temperatura, pH, tiempo de residencia, etc).

2.2.2. Procesos patentados.

La mayoría de los procesos desarrollados para llevar a cabo la hidrólisis de proteínas están patentados, debido al interés económico del proceso; por ello, las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso, aparecen siempre descritas en unos márgenes muy amplios. En cualquier caso, no estudian los aspectos cinéticos del proceso, sino que lo abordan más bien de una forma empírica, en función del producto que se pretende obtener y de las características del mismo deseadas.

Maubois *et al.* (1981) desarrollaron un proceso para obtener un hidrolizado enzimático total de proteínas del lactosuero que no contiene prácticamente proteínas residuales y del que al menos el 50 % de los péptidos tienen de 2 a 5 aminoácidos. Además, el 70-90 % del nitrógeno proteico inicial se encuentra en forma de péptidos de menos de 10 aminoácidos y el contenido en aminoácidos libres es inferior al 15 %. La enzima usada es pancreatina (mezcla de tripsina, quimotripsina y otras enzimas proteolíticas), capaz de reproducir la digestión que ocurre *in vivo* en los seres vivos. Las condiciones de operación en la zona de reacción son pH = 7-8.5, T = 40–45 °C, la concentración inicial de sustrato es de 80 g/L, y la relación enzima-sustrato del 12 %, todas ellas condiciones muy próximas a las que se dan en los organismos vivos. El pH se mantiene constante mediante la adición de Na₂CO₃, Ca(OH)₂, NaOH. El proceso comprende un pretratamiento consistente en una ultrafiltración del suero, seguida de una hidrólisis enzimática llevada a cabo en un reactor provisto de una membrana de ultrafiltración con un tamaño de poro adecuado de 2000-10000 Da, trabajando así en continuo; puede existir recirculación del hidrolizado al reactor. La reacción se mantiene durante 7-8 horas. Los hidrolizados obtenidos se corrigen adicionando los aminoácidos perdidos durante la hidrólisis, y se emplean como alimento con características nutricionales específicas, en enfermos con insuficiencia pancreática o enfermedades metabólicas.

Chiang *et al.* (1982) pusieron a punto un procedimiento para la obtención de un hidrolizado de proteínas adecuado, tanto por su sabor como por su distribución de tamaños moleculares, para usarlo en productos consumidos por personas con dieta entérica. La materia prima usada es lactoalbúmina de suero con bajo contenido en lactosa, y como enzimas se ensayan diferentes preparados comerciales. Las condiciones de operación son pH = 3-10 y T = 40–70 EC. El tiempo de reacción varía de 2 a 50 horas según las condiciones de pH y temperatura empleadas. El pH se mantiene constante por adición de hidróxido de calcio. El proceso se continúa hasta obtener un hidrolizado final que contenga al menos un 50 % de una mezcla de aminoácidos, di y tripéptidos, y no más del 25 % de polipéptidos con más de diez aminoácidos. Finalmente, la mezcla de reacción se calienta a una temperatura y durante un tiempo suficiente para desactivar la enzima, retirándose

2. INTRODUCCIÓN

el material sólido para obtener el hidrolizado final. Las enzimas usadas son Fungal protease (obtenida de *Aspergillus oryzae*, con un máximo de actividad a pH = 9 y T = 55 °C), una proteasa bacteriana (obtenida por fermentación de *Bacillus licheniformis*, que contiene endopeptidasas y tiene un máximo de actividad de pH = 5.5 y T = 55 °C), concentrado proteolítico HT, papaína (de origen vegetal) y pancreatina (de origen animal). Los mejores resultados en cuanto a sabor y distribución de tamaños moleculares, se obtienen con la proteasa fúngica; para mejorar la accesibilidad de la enzima a la proteína y por tanto evitar este efecto, se pretrata la proteína durante 30 minutos con ácido sulfúrico al 2 %, o 10 minutos hirviendo a pH = 8, obteniéndose mejores rendimientos con el pretratamiento básico. Con las otras enzimas se obtienen péptidos muy amargos.

Chang (1984) desarrolló un proceso para obtener hidrolizados enzimáticos de proteínas con propiedades organolépticas apropiadas para ser usados con fines dietéticos, en concreto en dietas hospitalarias, para lo que deben contener al menos el 80 % en forma de péptidos de tamaño molecular inferior a 500 Da y el 95 % menor de 2000 Da. Se pueden usar diferentes proteínas, pero debido a que para dietas hospitalarias el hidrolizado debe tener un bajo contenido en lactosa y sales, se elige la ovoalbúmina como sustrato, que se prepara en solución acuosa al 15 %, ajustándose el pH en rango alcalino (pH = 7-10), utilizándose NaOH como base para mantener constante el pH. La temperatura de trabajo es 50-80 °C, calentando rápidamente (menos de 15 minutos) para evitar la insolubilización de la proteína por gelación. Las enzimas usadas son mezclas de proteasas fúngicas neutras y alcalinas de *Aspergillus oryzae*, con acción endo- y exopeptidasa, y pancreatina (mezcla de tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa). La reacción se lleva a cabo usando mezcla de las dos enzimas, adicionadas simultáneamente y manteniéndola durante seis horas, o por separado añadiendo primero la proteasa fúngica y manteniendo el proceso cinco horas, y a continuación la pancreatina manteniendo 12-17 horas. En cualquier caso, las enzimas se desactivan térmicamente (5-10 minutos a 90 °C, o 30-60 minutos a 75 °C). Para mejorar las propiedades organolépticas del producto final, se añade carbón activo, que más tarde se separa.

Tsugita *et al.* (1986) hidrolizaron la proteína adsorbida sobre una superficie sólida (vidrio o lechos de resina termorresistente) mediante una reacción sólido-gas usando vapor conteniendo cloruro de hidrógeno.

Scharf *et al.* (1986) prepararon hidrolizados funcionales de proteínas, con un contenido en proteína superior al 90 %, un contenido en ácidos nucleicos menor del 2 % y un contenido en lípidos por debajo del 1 %. Los pesos moleculares estaban en el rango 0.1–125 kDa.

2. INTRODUCCIÓN

Parker y Pawlett (1987) patentaron un método para controlar el sabor final de los hidrolizados. Una fuente proteica (pueden usarse proteínas de soja, de gluten, caseína, hemoglobina, extracto de levaduras, proteínas de suero y SCP) se somete a una primera hidrólisis con una endoproteinasa, obteniéndose un hidrolizado primario con fuerte sabor amargo, que es sometido a una segunda hidrólisis enzimática con aminopeptidasas para convertir los péptidos amargos en otros de sabor neutro; variando las condiciones de la segunda hidrólisis, pueden alterarse las características de sabor del producto final, pudiendo obtenerse sabores de queso, carne u otros. El proceso se lleva a cabo en solución acuosa a 25-45 °C y pH = 5-9.5 (pH = 7.5-8.5 para productos con sabores medios o blandos, y pH = 5.3-5.8 para productos con fuerte sabor).

Samuelsson y Poulsen (1987) obtuvieron una preparación peptídica de suero conteniendo péptidos de tamaño molecular 2000-6000 Da (la mayoría de 2000-2500 Da), hipoalergénica, y utilizable en productos alimenticios y estimulantes, como sustitutos de leche materna, bebidas proteicas y otros productos para personas alérgicas o con mala absorción de la lactosa. El proceso global consta de tres etapas:

- Pretratamiento de las proteínas del lactosuero. Se usa suero procedente de la precipitación ácida de la caseína o suero de quesería, con bajo contenido en caseína para evitar sabores amargos en el hidrolizado. El suero se diafiltra para eliminar la lactosa, subir el pH y aumentar el contenido en proteína del 0.5 % al 20 %.
- Hidrólisis del WPC, pudiendo usarse varias proteasas (Rhozyme 41 PC, Alcalase 0.6L, Corolasa PP, utilizadas por separado o conjuntamente), dependiendo de la calidad y condiciones del producto de partida, manteniéndose constante el pH por adición de NaOH. Las condiciones de operación son: $s_0 = 5 \%$, $T = 50 \text{ °C}$ y $\text{pH} = 7.5-8$. La hidrólisis se mantiene hasta alcanzar grados de hidrólisis de 9–18 %.
- Recuperación de los péptidos. Se hace por ultrafiltración del hidrolizado a través de una membrana de 6000 Da de tamaño de corte. El hidrolizado final se complementa con el resto de nutrientes necesarios (sales, vitaminas, sacarosa, grasa y almidón), y se procede a su mezcla, emulsificación, concentración, esterilización y, finalmente, secado por atomización.

Chataud et al. (1988 a) pusieron a punto un procedimiento para preparar una mezcla peptídica rica en di y tripéptidos utilizable en nutrición artificial o dietética, a partir de un hidrolizado de proteínas, comprendiendo las siguientes etapas: cromatografía del hidrolizado en una columna de resina cambiadora de cationes bajo forma ácida, lavado de la columna con agua, elución de la columna con una solución básica (NaOH ó KOH 2 N) y recuperación de la fracción enriquecida en

2. INTRODUCCIÓN

di y tripéptidos. La mezcla peptídica final rica en di y tripéptidos, se purifica por ultrafiltración. El hidrolizado enzimático utilizado se prepara a partir de ovoalbúmina, caseína, seroalbúmina, hemoglobina decolorada, proteínas de pescado y de soja, pudiendo usar diferentes enzimas: de origen bacteriano (utilizables en medios ácidos -Molsin Fujisawa-, neutro -Neutrase- o alcalino -Alcalase), de origen animal (pepsina, tripsina y quimotripsina) o de origen vegetal (papaína).

Chataud *et al.* (1988 b) obtuvieron un hidrolizado rico en di y tripéptidos, con un bajo contenido en aminoácidos libres, utilizable en alimentación artificial y dietética. La concentración inicial de proteína en la solución acuosa a hidrolizar es del 5–20 % en peso, y las proteínas que se pueden usar son ovoalbúmina, lactoalbúmina, caseína, seroalbúmina, hemoglobina decolorada, proteínas de pescado y de soja. Se usa una asociación de tres enzimas, usadas simultánea o sucesivamente: proteasa bacteriana neutra obtenida de *Bacillus subtilis* (Neutrase), proteasa bacteriana alcalina de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* (Alcalase) y enzima pancreática de origen animal, incluyendo tripsina o un concentrado de ella (PEM). Las condiciones de reacción son T = 40–50 °C, pH = 7-9, concentraciones iniciales de sustrato de 5–20 % y relaciones enzima-sustrato de 0.5–1 % para la Neutrase y el PEM y de 5–10 % para la Alcalase, y tiempos de reacción inferiores a 300 minutos. Se analizan diferentes asociaciones de enzimas, así como el uso individual de las mismas, observándose buenos resultados cuando se usan las enzimas individuales o de dos en dos, aunque los mejores resultados se obtienen usando la asociación Alcalase-Neutrase-PEM añadidas con un cierto intervalo de tiempo entre ellas. En cuanto al orden de adición de las enzimas, no se obtienen resultados concluyentes respecto a su influencia. El hidrolizado obtenido se purifica por ultrafiltración.

De Rham (1989) puso a punto un proceso para reducir la alergenicidad de las proteínas del lactosuero (especialmente la β -lactoglobulina). Se prepara una disolución acuosa de proteínas del lactosuero al 0.5 – 5 % en peso de proteínas, se ajusta el pH con HCl o NaOH a pH = 5.5-8.5, y el contenido en Ca^{+2} libre a 6-15 mmol/L por adición de Ca_2Cl , y se calienta a 90–140 °C durante 2-10 minutos, hasta que el contenido en β -lactoglobulina residual alergénica sea inferior al 0.1 % del contenido inicial, para que el hidrolizado obtenido pueda usarse en leches adaptadas, lactosuero dulce desmineralizado, etc., sin problemas de alergias.

Jost *et al.* (1989) desarrollaron un proceso para la obtención de un hidrolizado de proteínas del lactosuero de alergenicidad reducida mediante hidrólisis enzimática. La materia prima sufre una primera hidrólisis usando enzimas activas a pH básico o neutro como tripsina, quimotripsina o pancreatina, sometiendo el hidrolizado a 80–100 °C y pH = 6-8 durante 3-10 minutos, con objeto de

2. INTRODUCCIÓN

desnaturalizar las proteínas menores. A continuación se enfría el hidrolizado a 40–60 °C, se ajusta el pH a 7.5 y se somete a una segunda hidrólisis que puede hacerse de forma discontinua durante 60-180 minutos, usando tripsina, pancreatina, o una mezcla de tripsina y quimotripsina o de forma continua en un reactor tubular con flujo turbulento durante 2 - 60 minutos; esta segunda opción da mejores resultados. La enzima se desactiva con un tratamiento térmico a 75 °C durante 5 minutos. Seguidamente se esteriliza a 125-135 °C durante 2-3 minutos. El hidrolizado final se seca por pulverización o liofilización y se emplea en fórmulas infantiles.

Faigh *et al.* (1989) desarrollaron un nuevo método para la hidrólisis de proteínas alimentarias diversas (caseína, lactoalbúmina, proteínas de pescado, de pollo, de carne, de huevo, de soja), usando proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* y extracto enzimático de páncreas porcino, ensayadas individual y conjuntamente en la proporción 0.9:1-1.1:1. La hidrólisis se lleva a cabo en solución acuosa a 30-50 EC y pH = 4.9-9.5 (preferiblemente pH = 6.5-7.5), durante el tiempo necesario para alcanzar el grado de hidrólisis deseado (8-24 horas). Las enzimas se desactivan por tratamiento térmico a 90 EC durante 10 minutos. El hidrolizado obtenido es aplicable en alimentación, debido a su escaso sabor amargo, especialmente el obtenido a partir de proteínas de soja.

Piske (1991) preparó hidrolizados de proteínas para usos nutricionales a partir de proteínas de leche desnaturalizadas térmicamente, digeridas posteriormente con pancreatina, o con mezclas de pancreatina y pronasa. Se obtienen así hidrolizados con un perfil de péptidos formados principalmente por di y tripéptidos, carentes de amargor y relativamente baratos.

Nielsen y Hvass (1993) utilizaron las proteínas del suero obtenido por precipitación ácida para la obtención de productos dietéticos organolépticamente aceptables y de alergenicidad reducida.

Kaneko *et al.* (1994) consiguieron degradar selectivamente la β -lactoglobulina contenida en el lactosuero. A una solución acuosa de las proteínas séricas se añade una proteasa derivada de un hongo filamentoso perteneciente al género *Aspergillus*, una de *Bacillus subtilis*, una de *Streptomyces griseus*, tripsina o quimotripsina. La mezcla se mantiene a pH = 7-9 y a 30-40 °C durante 5-20 horas.

Kwong y Vadehra (1994) elaboraron un método para eliminar el amargor de los hidrolizados enzimáticos de proteínas mediante la incubación de los mismos con *Lactobacillus helveticus* a 50-55 °C. La duración de la incubación varía de 12 a 20 horas y el pH se ajusta entre 5.5 y 7.2 dependiendo de la proteína concreta. El amargor desaparece ya que los péptidos amargos permean

2. INTRODUCCIÓN

al interior de las células y son hidrolizados por una serie de proteasas intracelulares para dar lugar a productos no amargos que vuelven al medio.

Tomita *et al.* (1994) obtuvieron un hidrolizado de proteínas lácteas consistente en una mezcla de péptidos y aminoácidos libres que activan la proliferación de células cutáneas en humanos. Los péptidos del hidrolizado tienen un peso molecular inferior a 1000 Da, con una relación de aminoácidos aromáticos libres / aminoácidos aromáticos totales de al menos el 90 %. El hidrolizado puede ser empleado en la formulación de cosméticos para piel y cabello.

Mendy *et al.* (1996) obtuvieron un hidrolizado de proteínas del lactosuero de baja alergenicidad con una composición de aminoácidos de al menos un 2 % en triptófano, y por debajo del 5 y 2.8 % en treonina y metionina respectivamente. Entre el 40 y el 60 % del hidrolizado se presenta en cadenas de 4 a 10 restos aminoácidos.

Nielsen *et al.* (1997) produjeron un hidrolizado de proteínas del lactosuero de buen sabor y con un alto rendimiento usando una combinación de hidrólisis a pH no constante y ultrafiltración. Un sustrato con un contenido en proteína de al menos el 65 % se mezcla con agua para conseguir una suspensión con una concentración del 7 al 20 %, se ajusta el pH a 8 y se realiza la hidrólisis con dos proteasas hasta una extensión del 17–35 %, sin mantener constante el pH. Tras la inactivación de las proteasas, el hidrolizado se ultrafiltra por una membrana de corte 10 kDa y el permeado obtenido se trata con carbón activo. El producto final puede ser concentrado por nanofiltración y/o evaporación.

Cordle *et al.* (1998) desarrollaron un método para obtener hidrolizados con péptidos de peso molecular inferior a 10 kDa, eliminar el amargor y reducir la alergenicidad. Se utilizó caseína, proteínas séricas y de soja como sustrato. El producto se pasa por un lecho de siloxano (octasiloxano y octadecilsiloxano) de una profundidad de 2 a 4 veces el diámetro.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El trabajo que se describe en la presente Memoria forma parte de la labor investigadora que el Grupo de Biorreactores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada está llevando a cabo en el campo de la hidrólisis enzimática de biopolímeros y de las separaciones con membranas.

Una de sus líneas está encaminada a desarrollar la tecnología adecuada para la producción de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral. Estos preparados son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición.

Las dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago. Los hidrolizados que entran en su fórmula deben ser osmóticamente equilibrados, hipoalergénicos y de escaso sabor amargo, es decir, deben estar constituidos fundamentalmente por di y tripéptidos. Generalmente, la producción de estos hidrolizados se ha llevado a cabo en reactores discontinuos, lo que ha encarecido enormemente el proceso debido a la cantidad de enzima requerida para obtener el producto adecuado. Además a este factor económico hay que añadir el alto contenido en aminoácidos normalmente presentes, que puede provocar en lactantes problemas de hiperosmotividad dando lugar a diarreas y, por tanto, invalidar el hidrolizado en algunas de sus aplicaciones.

Por todo ello, el objetivo planificado para el desarrollo de esta Tesis Doctoral consistió en el estudio del proceso de hidrólisis enzimática de proteínas del lactosuero en un reactor de membrana donde se produce de forma continua la hidrólisis y la separación de los componentes de la mezcla reaccionante.

Para ello, el trabajo se dividió en las siguientes etapas:

- Selección del sustrato y la enzima más adecuados para el proceso.
- Desarrollo de la metodología que permitiera el control continuo de la hidrólisis y la medida de la actividad de la proteasa en nuestro sistema.
- Estudio cinético del proceso de hidrólisis.
- Estudio del proceso de separación por ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular adecuado.

3. OBJETIVOS

- Comparación del proceso de hidrólisis en un reactor discontinuo y en un reactor de membrana, que permitiera determinar la configuración del equipo y modo de operación idóneo para llevar este proceso a cabo a escala industrial.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Sustrato.

El sustrato empleado en esta investigación ha sido un concentrado de proteínas del lactosuero (WPC), Lactalbumin® 75 L, suministrado por Milei (Stuttgart, Alemania). Se ha determinado su contenido en proteína total por el método Kjeldahl (Norma UNE 64011) resultando un valor del 76 % en peso. El índice de solubilidad definido como el porcentaje en peso de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA) 0.8 M (13.6 %) es del 5.72 %. El análisis en humedad, azúcares y minerales por 100 g de sustrato aparece en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis del concentrado de proteínas del lactosuero.

Humedad	4.26 g
Lactosa	0.25 g
Cenizas	2.98 g
Sodio	202 mg
Potasio	700 mg
Calcio	470 mg
Fósforo	288 mg
Cloruros	63 mg

Las secuencias de aminoácidos, estructura primaria, de las proteínas mayoritarias en el lactosuero se recogen a continuación. Hay que significar que los aminoácidos aparecen identificados mediante el código de una letra (Apéndice 9.1) y que la secuencia indicada corresponde al precursor de la proteína. La proteína activa aparece una vez liberado el trozo de la cadena peptídica señalado en azul.

β-lactoglobulina

1 **M K C L L L A L A L T C G A Q A** L I V T Q T M K G L D I Q K
 31 V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E
 61 E L K P T P E G D L E I L L Q K W E N G E C A Q K K I I A E
 91 K T K I P A V F K I D A L N E N K V L V L D T D Y K K Y L L
 121 F C M E N S A E P E Q S L A C Q C L V R T P E V D D E A L E
 151 K F D K A L K A L P M H I R L S F N P T Q L E E Q C H I

α-lactoalbúmina

4. MATERIALES Y MÉTODOS

```

          5          10          15          20          25          30
1  M M S F V S L L L V G I L F H A T Q A E Q L T K C E V F R E
31 L K D L K G Y G G V S L P E W V C T T F H T S G Y D T Q A I
61 V Q N N D S T E Y G L F Q I N N K I W C K D D Q N P H S S N
91 I C N I S C D K F L D D D L T D D I M C V K K I L D K V G I
121 N Y W L A H K A L C S E K L D Q W L C E K L
```

Seroalbúmina

```

          5          10          15          20          25          30
1  M K W V T F I S L L L L F S S A Y S R G V F R R D T H K S E
31 I A H R F K D L G E E Q F K G L V L I A F S Q Y L Q Q C P F
61 D E H V K L V N E L T E F A K T C V A D E S H A G C E K S L
91 H T L F G D E L C K V A S L R E T Y G D M A D C C E K Q E P
121 E R N E C F L S H K D D S P D L P K L K P D P N T L C D E F
151 K A D E K K F W G K Y L Y E I A R R H P Y F Y A P E L L Y Y
181 A N K Y N G V F Q D C C Q A E D K G A C L L P K I E T M R E
211 K V L A S S A R Q R L R C A S I Q K F G E R A L K A W S V A
241 R L S Q K F P K A E F V E V T K L V T D L T K V H K E C C H
271 G D L L E C A D D R A D L A K Y I C D N Q D T I S S K L K E
301 C C D K P L L E K S H C I A E V E K D A I P E N L P P L T A
331 D F A E D K D V C K N Y Q E A K D A F L G S F L Y E Y S R R
361 H P E Y A V S V L L R L A K E Y E A T L E E C C A K D D P H
391 A C Y S T V F D K L K H L V D E P Q N L I K Q N C D Q F E K
421 L G E Y G F Q N A L I V R Y T R K V P Q V S T P T L V E V S
451 R S L G K V G T R C C T K P E S E R M P C T E D Y L S L I L
481 N R L C V L H E K T P V S E K V T K C C T E S L V N R R P C
511 F S A L T P D E T Y V P K A F D E K L F T F H A D I C T L P
541 D T E K Q I K K Q T A L V E L L K H K P K A T E E Q L K T V
571 M E N F V A F V D K C C A A D D K E A C F A V E G P K L V V
601 S T Q T A L A
```

4.2. Proteasas.

Las proteasas comerciales seleccionadas en este trabajo han sido:

4.2.1. Alcalase® 0.6 L.

Es una enzima bacteriana suministrada por Novo (Bagsvaerd, Dinamarca) obtenida mediante la fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*. Se presenta como un líquido marrón de ligero olor a fermentado.

El mayor componente enzimático es subtilisina (E.C. 3.4.21.62), una endoproteinasa extracelular del tipo serina. El nombre subtilisina deriva del nombre de la especie bacteriana *Bacillus subtilis*, de la cual se aisló la enzima por primera vez. La subtilisina posee una triada catalítica compuesta por Asp32, His64 y Ser221, siendo la acilación la etapa limitante en la hidrólisis de enlaces amido. Este tipo de enzimas presenta una amplia especificidad, con preferencia por los restos no cargados en P1. Las subtilisinas son covalentemente inactivadas por inhibidores como fluorofosfato de diisopropilo (DFP) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

El peso molecular aproximado de Alcalase es 27300 Da. El rango óptimo de temperatura es 50-70 °C y actúa a pHs comprendidos entre 6 y 10. Para la hidrólisis de proteínas del lactosuero las condiciones óptimas son T = 50 °C y pH = 8.5.

4.2.2. Multifect® P-3000

Es una proteasa bacteriana de *Bacillus amyloliquefaciens* expresada en una cepa de *Bacillus subtilis* modificada genéticamente. Su componente mayoritario, al igual que en Alcalase, es subtilisina. Es suministrada por Genencor (Rochester, Estados Unidos) en forma de líquido marrón de pH = 6.2, $\rho = 1.09$ g/mL y ligero olor a fermentado. La enzima es activa a partir de pH = 4.5, con una actividad significativa a partir de pH = 6.5 y un óptimo a pH = 8.5. En cuanto a la temperatura, es activa hasta 60 °C para cortos períodos de tiempo. La temperatura óptima para hidrólisis de proteínas séricas es 50 °C.

4.2.3. Protex® 6 L

Es una proteasa bacteriana alcalina procedente de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis* suministrada por Genencor (Rochester, Estados Unidos) en forma de líquido marrón de peso específico 1.075, pH = 5.4 y ligero olor a fermentado. La parte activa está formada por subtilisina. El peso molecular es de 22500 Da, comprobado en nuestro laboratorio por técnicas cromatográficas, y el punto isoelectrico es 6.8. El rango de pHs para esta enzima está entre 7 y 10 y el de temperaturas entre 25 y 70 °C. Para el sustrato elegido las condiciones óptimas son 50 °C y pH = 8.5. La enzima puede ser desactivada al pH de operación manteniéndola durante 5-10 min a 80-85 °C.

4.2.4. PEM® 2500 S

Es un complejo proteolítico formado por enzimas pancreáticas purificadas. Consiste en una mezcla libre de sales de tripsina y quimotripsina bovinas y porcinas. Es comercializado por Novo (Bagsvaerd, Dinamarca) en forma de polvo.

La tripsina (E.C. 3.4.21.4) presenta una fuerte preferencia por la rotura de enlaces amido en los que intervienen restos aminoácidos de arginina o lisina, siendo la preferencia por la primera de 2 a 10 veces la de la segunda. La quimotripsina (E.C. 3.4.21.1) por su parte hidroliza mayoritariamente enlaces formados por los grupos carboxilo de tirosina, fenilalanina, triptófano y leucina. La triada catalítica para ambas enzimas está formada por los restos His57, Asp102 y Ser195.

El PEM es soluble en agua a todas las concentraciones usuales. Puesto que la velocidad de disolución es comparativamente baja a pH neutro, se recomienda preparar la disolución en HCl 1 mM y ajustar al pH deseado con una tampón adecuado o con una base diluida. Este procedimiento tiene también la ventaja de evitar cualquier pérdida en la actividad de la enzima en disolución, puesto que presenta la máxima estabilidad a pH = 3. El PEM ofrece su máxima actividad a pH = 8.0. La temperatura óptima depende de la proporción entre tripsina porcina y bovina puesto que la temperatura óptima para tripsina porcina es 50 °C y 38 °C para bovina.

4.3. Métodos.

4.3.1. Determinación del contenido en proteína.

Método Kjeldahl (Norma UNE 64011). Este método se emplea para determinar la proteína bruta como resultado de multiplicar el nitrógeno liberado en forma amoniacal, en las condiciones del método, por un factor de transformación ponderal del nitrógeno en proteína (6.38 en el caso de proteínas del lactosuero).

Se pesan de 0.15 a 0.30 g de muestra, se introduce la muestra en un matraz Kjeldahl, se añaden 2 g de catalizador (2g de selenio en polvo, 10 g de sulfato de mercurio y 64 g de sulfato de potasio anhidro) y 4 mL de ácido sulfúrico. Se agita bien y se deja la muestra en contacto con el catalizador y el ácido sulfúrico durante 5 min.

Se calienta el matraz Kjeldahl en la batería de ataque durante 5 min, se eleva fuertemente la temperatura y se deja transcurrir el tiempo suficiente para que se obtenga un líquido transparente (aproximadamente 30 min). Se deja enfriar el matraz a la temperatura ambiente y a continuación se añaden 6 mL de agua destilada, lavando el cuello del matraz. Éste se acopla en el aparato de destilación Pro-Nitro S-627 de Selecta (Abrera, España), se añaden 25 mL de NaOH 35 % y se procede a la destilación del amoníaco que se recoge sobre una matraz erlenmeyer, que contiene 10 mL de la disolución de ácido bórico al 4 % con unas gotas de disolución de indicador (0.125 g de rojo de metilo con 0.018 g de azul de metileno en 100 mL de etanol al 95 %) y 10 mL de agua.

La cantidad de destilado que se recoge es de 200 mL. Terminada la destilación (4 min), se añaden unas gotas del indicador y se valora con disolución de ácido clorhídrico 0.1 N hasta viraje del indicador a color violeta (pH = 5.1).

4.3.2. Determinación del nitrógeno soluble.

El índice de solubilidad en ácido tricloroacético (TCA) se determina en una concentración de 0.8 M (13.6 %). Normalmente se emplea una concentración del 4 % en proteína aunque este índice es relativamente insensible respecto a las variaciones en concentración.

Se pipetea 5 mL de la correspondiente suspensión/disolución de proteína y se añaden a un tubo de centrifuga. Se adicionan 2.5 mL de TCA 2.4 M y se agita bien. El contenido del tubo es centrifugado a 4000 g durante 10 minutos y se determina la concentración de nitrógeno en el sobrenadante mediante el método Kjeldahl.

4.3.3. Composición en aminoácidos.

La determinación del perfil de aminoácidos de una proteína o cadena peptídica en general requiere tres pasos: hidrólisis de la proteína hasta obtener aminoácidos libres, conversión de los aminoácidos en feniltiocarbamil derivados y análisis de éstos mediante HPLC.

Hidrólisis de la proteína hasta obtener aminoácidos libres.

Se realiza mediante una hidrólisis química en presencia de ácido a elevada concentración. Con el fin de poder determinar todos los aminoácidos, y puesto que la hidrólisis ácida destruye de forma total o parcial la metionina, cisteína y el triptófano, también se realiza una oxidación perfórmica que protege la cisteína y la metionina mediante su conversión en ácido cisteico y metionín sulfona, respectivamente. Para determinar el triptófano se lleva a cabo una hidrólisis básica.

Hidrólisis ácida.

Se introducen 20 μ L de una disolución de proteína (1.5 mg/mL) en viales de vidrio de 5 cm de altura y 0.4 cm de diámetro interno. Los viales se colocan dentro de un vial de hidrólisis al que previamente se han añadido 0.2 mL de HCl 6 N. Tras sellar el vial a vacío, se introduce durante 20 horas en una estufa a 110 °C. Durante este tiempo todas las proteínas y péptidos son convertidos en aminoácidos libres.

Oxidación perfórmica.

Se introducen, en viales iguales a los utilizados en la hidrólisis ácida, 20 μ L de una solución de la proteína (1.5 mg/mL) y la misma cantidad de reactivo perfórmico, permitiendo que la reacción se lleve a cabo durante 4 horas en baño de hielo. Una vez transcurrido este periodo de tiempo, se adicionan 5 μ L de ácido bromhídrico y, tras llevar las muestras a sequedad y redissolverlas en 15 μ L de HCl, se realizó una hidrólisis ácida igual a la descrita anteriormente.

Hidrólisis básica.

En tubos normales se introducen 8 mL de una solución de la proteína (10 mg/mL de agua a 100 °C) y 4.2 g de Ba(OH)₂. Posteriormente, se cierran los tubos bajo atmósfera de nitrógeno y se mantienen a 120 °C por espacio de 8 horas. Tras enfriar las soluciones se acidifican las muestras hasta pH = 3 con HCl concentrado. Por último, se lleva el volumen a 15 mL con agua y se filtra a través de papel.

Conversión de los aminoácidos en feniltiocarbamil derivados.

Este método está basado en la reacción de fenilisotiocianato con los aminoácidos, formando feniltiocarbamil derivados según la reacción:



Los viales, tras la hidrólisis ácida o básica, son desecados a vacío. A continuación se le añade un patrón interno, metionín-sulfona 0.4 mM o norleucina 0.4 mM en el caso de las muestras sometidas a oxidación per fórmica, en proporción 1:1 con respecto a la muestra, procediéndose a un nuevo secado a vacío. Asimismo, con objeto de tener una muestra patrón de aminoácidos, se procede a introducir en un nuevo vial el patrón de aminoácidos y el patrón interno en proporción 1:1. Este vial se trata de igual manera que una muestra con el fin de convertir los aminoácidos libres en sus feniltiocarbamil derivados. Tras añadir a los viales 10 µL de solución desecante (metanol-agua-trietilamina 2:1:1, v/v/v), se procede a secar una vez más a vacío. A continuación, se adicionan 20 µL de agente derivatizante (metanol-agua-fenilisotiocianato-trietilamina 7:1:1:1, v/v/v/v), con el fin de formar los feniltiocarbamil derivados. Transcurridos 20 minutos de reacción, se elimina el exceso de reactivo por secado a vacío durante 90 minutos.

Análisis mediante HPLC de los feniltiocarbamil derivados.

Un vez formados, los derivados son separados por HPLC en fase inversa en una columna modelo PICO-TAG Fisiológicos de 30 cm de longitud, suministrada por Millipore-Waters (Milford, Estados Unidos). Su fase estacionaria es octadecilsilica de 4 µm de diámetro de partícula.

El tampón de disolución consiste en fosfato dibásico de sodio 5 mM tamponado a pH 7.4 con ácido fosfórico al 10 % (p/v) y suplementado con un 5 % (v/v) de acetonitrilo. La fase móvil A consiste en una disolución 70 mM de acetato sódico trihidratado ajustada a pH 6.45 con ácido acético al 10 % (v/v), a la que se añade tras el ajuste de pH un 2.5 % en volumen de acetonitrilo. Una vez preparada la mezcla, se filtra por 0.25 µm y se desgasifica por ultrasonidos. La fase móvil B está

4. MATERIALES Y MÉTODOS

compuesta por acetonitrilo-agua-metanol 9:8:3 (v/v/v). Antes de su utilización es sometida a desgasificación por ultrasonidos.

Las muestras obtenidas de feniltiocarbamil derivados se resuspenden en el tampón de disolución, y se analizan en un sistema de gradientes. El gradiente optimizado de fases móviles A y B se indica en la Tabla 9.

Tabla 9. Gradiente óptimo para el análisis de feniltiocarbamil derivados por HPLC.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	% Fase A	% Fase B	Variación del gradiente
Inicial	1.0	100	0	-
13.5	1.0	97	3	Instantáneo
24.0	1.0	94	6	Convexo
30.0	1.0	91	9	Convexo
50.0	1.0	66	34	Convexo
60.0	1.0	64	36	Lineal
60.5	1.0	0	100	Lineal
66.0	1.0	0	100	Lineal
67.0	1.0	100	0	Lineal

A la salida de la columna cromatográfica, los aminoácidos son detectados por los picos de absorción a 254 nm. La cuantificación se lleva a cabo comparando cada muestra con un cromatograma patrón, usando en el cálculo el área relativa de cada pico y la recuperación del patrón interno.

4.3.4. Selección de la enzima.

La medida de la actividad enzimática es el criterio empleado en la selección de la enzima. Los métodos existentes consisten en ensayos estandarizados de digestión de un sustrato dado en condiciones específicas de pH y T, lo que limita la aplicabilidad de los resultados obtenidos a sustratos y condiciones de operación diferentes. Por ello, el método que se ha empleado en esta investigación es la hidrólisis en discontinuo del sustrato, proteínas del lactosuero, en las condiciones óptimas de pH y T de cada enzima preseleccionada, Tabla 10.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso de hidrólisis se realiza en un reactor discontinuo tanque agitado de 2 L de capacidad, con una concentración inicial de proteína, $s_0 = 50 \text{ g/L}$ y una relación enzima-sustrato, $E/S = 1\%$. La reacción se sigue durante 4 horas por el consumo de base, NaOH 2 N, necesario para mantener el pH constante, definiendo el grado de hidrólisis aparente como:

$$x_{ap} = \frac{M_B}{M_P h_T} \quad [4.2]$$

donde MB = base añadida (mol)

MP = masa de proteína (kg)

hT = enlaces peptídicos en la proteína (mol/kg)

Tabla 10. Condiciones óptimas para las enzimas preseleccionadas.

Proteasa	pH	T (°C)
Alcalase 0.6L	8.5	50
Multifect P3000	8.5	50
Protex 6L	8.5	50
PEM 2500S	8.0	50

4.3.5. Determinación del grado de hidrólisis.

Para seguir la cinética de la hidrólisis de proteínas es necesario determinar el grado de hidrólisis, x , definido según Adler-Nissen (1986) como la fracción de enlaces peptídicos hidrolizados respecto a los enlaces totales. El grado de hidrólisis se relaciona con el consumo de base necesario para mantener el pH constante durante el proceso mediante la expresión:

$$x = \frac{M_B}{M_P \alpha h_T} = \frac{x_{ap}}{\alpha} \quad [4.3]$$

El grado de disociación o de protonación de los grupos liberados, α , viene dado por:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad [4.4]$$

y por tanto

$$x = x_{ap} (1 + 10^{pK-pH}) \quad [4.5]$$

quedando de manifiesto la necesidad de conocer el valor del pK de la proteína para la determinación del grado de hidrólisis por el consumo de base. Dicho valor se calcula a partir de la valoración de la proteína nativa y de la proteína parcialmente hidrolizada.

El dispositivo experimental utilizado para los procesos de hidrólisis y valoración de las proteínas se esquematiza en la Figura 2. Consta de un reactor encamisado de 250 mL de capacidad, con tapa separable provista de bocas esmeriladas y agitación magnética. Al reactor se acopla un valorador automático Titrino 718 Metrohm (Herisau, Suiza) que incluye sondas de temperatura y pH y bureta automática conectada a un reservorio de disolución valorada de NaOH 2 N para medida, ajuste y control de pH, con los siguientes errores absolutos en las medidas: pH 0.003, 0.1 °C y 0.001 mL.

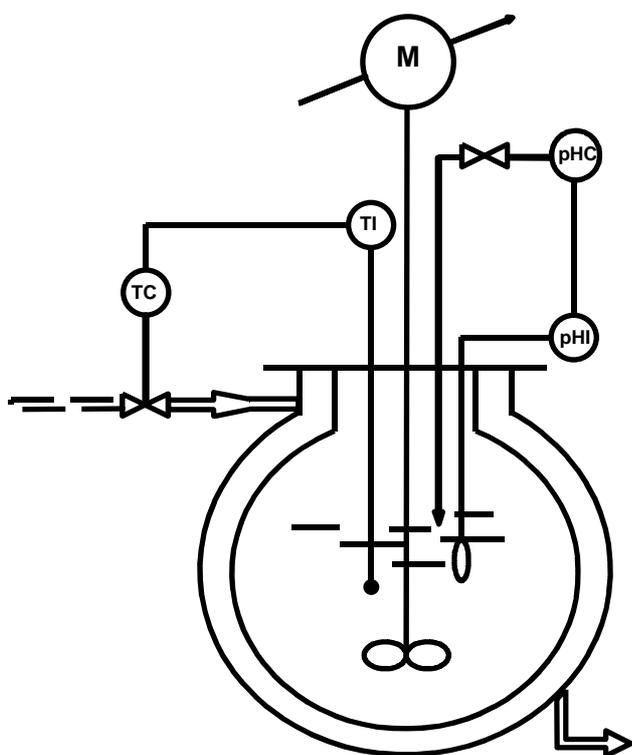


Figura 2. Dispositivo experimental para hidrólisis en discontinuo y valoración de proteína.

Cada suspensión de proteína se prepara reconstituyendo el concentrado en polvo con agua destilada precalentada a la temperatura de trabajo (50 °C) hasta una concentración de 10 g/L. Una vez obtenida la suspensión, se procede a su valoración (desde pH = 6.5 a 9.5 registrándose el volumen de base añadido frente al pH alcanzado) o se procede a la hidrólisis enzimática de la proteína nativa. Para ello el pH inicial se ajusta al pH de hidrólisis mediante el valorador automático. A continuación se añade la enzima y se registra el consumo de base necesario para mantener el pH constante en función del tiempo durante la hidrólisis. Al terminar el proceso de rotura de enlaces

hasta el nivel deseado, se añade HCl 35 % para bajar el pH a 6.5, valor a partir del cual se realiza la correspondiente valoración de la proteína hidrolizada hasta pH 9.5.

4.3.6. Determinación del peso molecular medio.

La determinación del peso molecular medio de los péptidos de un hidrolizado se realiza mediante la medida de la variación del punto de congelación de la disolución. Para ello se toman 2 mL de muestra y se añaden a un tubo, el cual se introduce en un aparato medidor del punto de congelación provisto de equipo de frío y sonda de temperatura de 0.001 K de precisión. El descenso crioscópico, ΔT , generado como consecuencia de la molalidad de la disolución se registra y se relaciona con el peso molecular medio mediante la expresión:

$$\Delta T = K_f \phi m \quad [4.6]$$

donde $K_f = 1.86 \text{ K/molal}$ para el agua

ϕ = coeficiente osmótico

m = molalidad de la solución.

4.3.7. Distribución de pesos moleculares.

La determinación de la distribución de pesos moleculares en un hidrolizado se realiza usando la técnica de HPLC descrita por Richter *et al.* (1983) y Knights (1985), que conduce a una buena separación de péptidos y a una correlación entre el logaritmo del peso molecular y el tiempo de retención.

En esta técnica se utilizan dos columnas TSK-gel G2000-SW de Tosohaas (Montgomeryville, Estados Unidos) de 30 cm de longitud y 7.5 mm de diámetro interno, conectadas en serie. El eluyente es guanidina clorhídrica 6 M a 1 mL/min. Los efluentes de la columna se detectan mediante lecturas de absorbancia a 280 nm. Las proteínas y péptidos utilizados como referencia se recogen en la Tabla 11.

En la Figura 3 se representa el tamaño molecular en función del tiempo de retención que constituye la curva de calibrado para la estimación de la distribución de pesos moleculares en los hidrolizados.

Tabla 11. Pesos moleculares y tiempos de retención de los patrones utilizados.

Patrón	Peso molecular (g/mol)	t_R (min)
Ovoalbúmina	44000	10.45
Quimotripsinógeno	25000	12.17
Ribonucleasa A	13700	13.93
Insulina	6000	16.52
Insulina A	2531	17.45
Péptido inductor del sueño	849	19.30
Phe-Gly-Gly	279	20.36

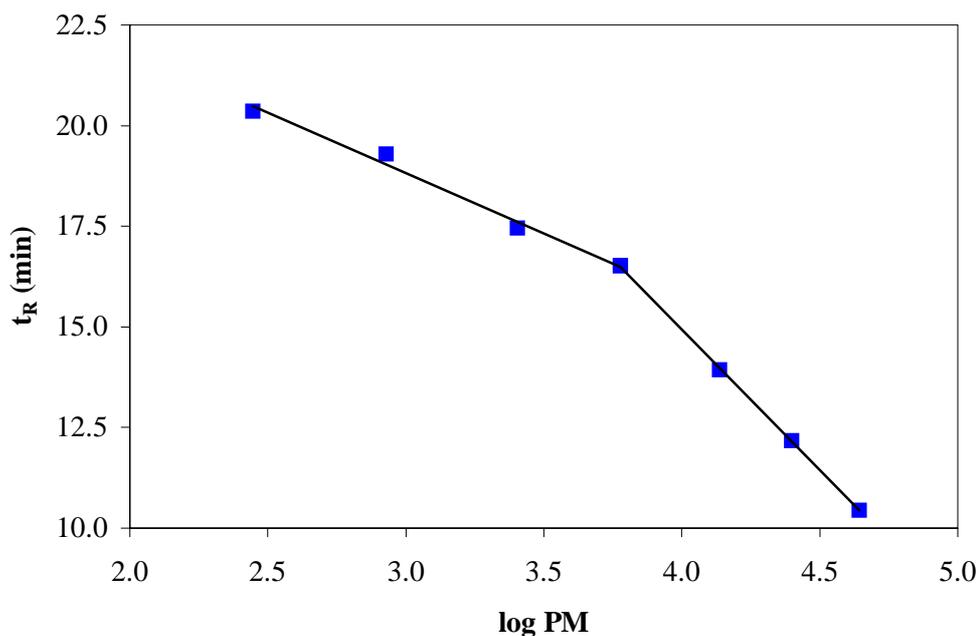


Figura 3. Curva de calibrado de la distribución de pesos moleculares.

Se observa una dependencia lineal entre tiempo de retención y logaritmo del peso molecular, distinguiéndose dos zonas correspondientes a pesos moleculares mayores y menores de 7000 Da, límite que coincide con el valor por debajo del cual encontramos péptidos solubles en TCA.

Los ajustes encontrados son los siguientes:

$$PM < 7000, t_R = -2.9909 \log PM + 27.796, r^2 = 0.9876$$

[4.7]

$$PM > 7000, t_R = -6.9972 \log PM + 42.929, r^2 = 0.9998 \quad [4.8]$$

4.3.8. Determinación de la actividad enzimática.

La actividad enzimática se determina según el siguiente ensayo normalizado: En un reactor termostatzado se añaden 200 mL de la disolución de proteína con una concentración de 10 g/L. Temperatura y pH se ajustan a las condiciones óptimas de la enzima (50 °C y 8.5 para Protex 6L). A esta mezcla se adiciona la proteasa en una dosis tal que la relación enzima/sustrato resulte ser 0.05, momento en el que comienza la hidrólisis. El pH es mantenido constante mediante la adición de una disolución valorada de NaOH 2M. La hidrólisis transcurre durante 15 minutos.

La actividad de la enzima se define como los moles de enlaces amido hidrolizados por gramo de enzima añadida.

4.3.9. Secado por atomización.

El secado por atomización de los hidrolizados se lleva a cabo en un secadero de laboratorio Büchi 190 (Flawill, Suiza), esquematizado en la Figura 4. La disolución se introduce en la cámara de secado mediante una bomba peristáltica que controla la velocidad del flujo. La alimentación se pulveriza en el atomizador mediante aire a presión de manera que el tamaño de gota es función de la presión y de la velocidad del flujo de alimentación. Este sistema está configurado en corrientes paralelas, es decir, el medio de secado, aire caliente, y el pulverizado fluyen en la misma dirección. El aire se toma del ambiente y es calentado por una resistencia hasta la temperatura de entrada en la cámara que se monitoriza con un sensor.

A medida que el conjunto gotas-aire de secado avanza, la temperatura disminuye y las partículas tendrán menor contenido de humedad. La mezcla se hace pasar por un ciclón donde se separa el aire de las partículas secas, a cuya entrada se encuentra otro sensor de temperatura. Las variables que pueden ser directamente controladas durante el secado son caudal de alimentación, caudal de aire comprimido y caudal y temperatura del aire de secado.

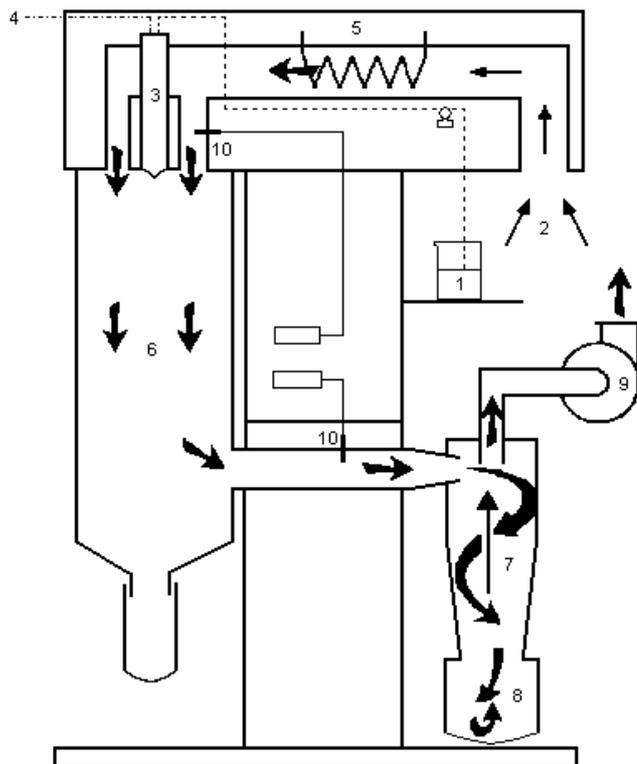


Figura 4. Secadero por atomización. (1) Alimentación, (2) Entrada de aire de secado, (3) Atomizador, (4) Aire a presión, (5) Calefacción del aire de secado, (6) Cámara de secado, (7) Ciclón, (8) Recogida del producto, (9) Ventilador de aspiración.

4.3.10. Determinación del potencial antigénico.

La determinación del potencial antigénico de un hidrolizado se realiza mediante un enzimoimmunoensayo de inhibición. Esta prueba consiste en la determinación del porcentaje de inhibición de la unión de IgG frente a proteínas de suero lácteo que ejercen la propia proteína o sus hidrolizados a diferentes concentraciones.

Material utilizado

- Placas Microtiter (Flow, Herts, Reino Unido).
- Lavador de placas Microtiter (SLT Instruments, Salzburgo, Austria).
- Lector de placas Microtiter (SLT Instruments, Salzburgo, Austria).
- Reactivos utilizados
- Tampón carbonato/bicarbonato: Na₂CO₃ 30 mM y NaHCO₃ 80 mM (pH 9.6).
- Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0.14 M, Na₂HPO₄ 17 mM, KCl 2.6 mM y KH₂PO₄ 1.4 mM (pH 7.4).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- Tampón PBS suplementado con gelatina al 0.1% (p/v) y Tween 20 al 0.05% (p/v) (PBSGT).
- Tampón PBSGT suplementado con gelatina al 2% (p/v) (PBSGTG).
- Suero IgG frente a proteínas del suero lácteo producido en conejo (Sigma, St. Louis, Estados Unidos).
- Suero anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Sigma, St. Louis, Estados Unidos).
- Sustrato: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) en concentración de 20 mg/ml en dimetil sulfóxido.
- Agua oxigenada al 10% (v/v).
- Tampón citrato: ácido cítrico 25 mM y Na₂HPO₄ 50 mM.
- Ácido sulfúrico 2.5 M.

Metodología

Las placas Microtiter son activadas mediante la adición de 200 μ L por pocillo del concentrado de proteínas de suero lácteo (Milei, Stuttgart, Alemania), 50 mg/mL, en tampón carbonato/bicarbonato e incubación a 4 °C, durante toda la noche. Tras lavar 3 veces las placas con tampón PBSGT, se bloquean los lugares libres con 200 μ L de PBSGTG y se incuban las placas a 37 °C durante 30 minutos.

Paralelamente en tubos Eppendorf se mezclan 200 μ L de las disoluciones de proteína nativa o de los distintos hidrolizados con 200 μ L del antisuero frente a proteínas del suero lácteo desarrollado en conejo y diluido 1:1000 en PBSGT. Tras incubar los tubos durante 1 hora a 37 °C, se lavan las placas 3 veces, con tampón PBSGT y se añaden 200 μ L de cada mezcla por pocillo (cada mezcla es ensayada por duplicado). A continuación, se procede a incubar las placas a 37 °C durante 1 hora.

Durante la primera incubación la proteína o restos proteicos presentes en las distintas muestras reaccionan con los anticuerpos específicos frente a proteínas del suero lácteo presentes en el suero de conejo. Posteriormente, al incubar en la placa las distintas muestras, los anticuerpos que hayan quedado sin reaccionar en la primera incubación se unirán a la proteína que cubre las paredes de los pocillos.

Tras lavar las placas 3 veces con tampón PBSGT, se añaden 200 μ L por pocillo de suero anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano diluido 1:5000 en PBSGT, incubándose 2 horas a 37

°C. Seguidamente, se procede al lavado de las placas de la misma forma que en anteriores pasos, añadiéndose 150 μ L por pocillo de tampón sustrato (formado por 100 mL de TMB, 5 mL de agua oxigenada al 10% y 20 mL de tampón citrato). Tras la aparición de color azul, se detiene la reacción con 50 μ L de H₂SO₄ 2.5 M, tornando la coloración a amarillo, con un máximo de absorción a 450 nm.

Considerando como máximo de absorbancia la obtenida en los pocillos en los que sólo hay antisuero, es decir, donde no existe inhibición, se calcula el porcentaje de inhibición a partir de la relación entre la densidad óptica obtenida en cada pocillo y la obtenida en el pocillo de absorbancia máxima. Se representan las correspondientes curvas de inhibición, las cuales expresan el porcentaje de inhibición de respuesta del suero específico en función del logaritmo de la concentración de proteína o hidrolizado ensayado en ese mismo pocillo. Por último, se calcula la concentración de cada hidrolizado y de la proteína nativa que produce el 30 % de inhibición, y la cantidad de proteína residual en cada hidrolizado por gramo de proteína de partida.

4.4. Reactor discontinuo.

La selección de la enzima más adecuada para la hidrólisis de proteínas y el estudio cinético de la reacción se llevan a cabo mediante una hidrólisis en discontinuo.

El reactor discontinuo consiste en un tanque de 3 L de capacidad cuya temperatura es controlada por un serpentín conectado a un baño de agua. Está acoplado a un controlador Titrino 718 Metrohm (Herisau, Suiza) que incorpora sondas de temperatura y pH y bureta automática. Un agitador Heidolph (Schwabach, Alemania) de velocidad variable permite que sea aceptable la hipótesis de mezcla perfecta en el seno de la mezcla reaccionante.

El sustrato se prepara solubilizando la cantidad requerida de proteína en agua destilada precalentada a la temperatura de trabajo. El pH se ajusta al pH de hidrólisis añadiendo NaOH 2N. A continuación se añade la enzima en la relación E/S deseada y se registran el tiempo de reacción y el consumo de base necesario para mantener el pH constante durante el proceso de rotura de enlaces.

4.5. Reactor de membrana.

4.5.1. Unidad de reacción y módulo de separación.

La hidrólisis continua de las proteínas séricas se realiza en un reactor de membrana como el esquematizado en la Figura 5. El sistema principal incluye: un tanque de 3 L de capacidad, una membrana plana de ultrafiltración, una bomba rotatoria de recirculación y un controlador de pH.

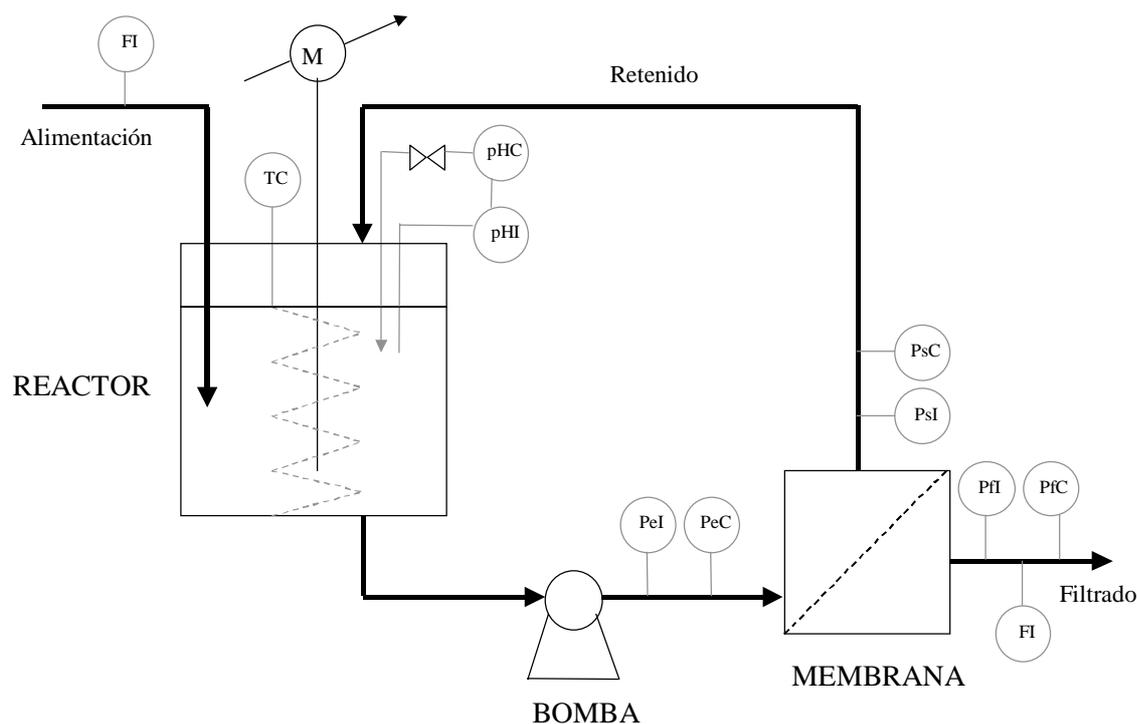


Figura 5. Reactor de membrana para la hidrólisis continua de proteínas.

Alimentación de sustrato:

La suspensión de WPC es preajustada al pH de hidrólisis y llevada a la temperatura de trabajo. El sustrato se añade al reactor a un caudal igual al flujo de permeado.

Control de la temperatura:

La temperatura del tanque de reacción se mantiene constante gracias a un serpentín conectado a un baño de agua a la temperatura adecuada.

Control del pH:

Se consigue a través de un controlador, Titrino 718 Metrohm (Herisau, Suiza), provisto de sondas de temperatura y pH y bureta automática conectada a un reservorio de disolución valorada de

NaOH 2 N para medida, ajuste y control de pH, con los siguientes errores absolutos en las medidas: pH 0.003, 0.1 °C y 0.001 mL.

Recirculación:

Se lleva a cabo mediante una bomba rotatoria de velocidad variable de Cole-Parmer (Chicago, Estados Unidos) que permite obtener caudales de hasta 15 L/min. La bomba está conectada entre el tanque de reacción y la entrada al módulo de membrana por medio de tubo Tygon Masterflex (Chicago, Estados Unidos).

Tanque de reacción:

Es cilíndrico y construido en vidrio en su parte lateral con base y tapa de teflón. Tiene bocas en su parte superior para sondas de temperatura y pH, alimentación de sustrato, retorno del retenido y adición de NaOH para control del pH. En la base posee dos salidas para conexión con la bomba de recirculación y desagüe. La agitación mecánica es proporcionada por un agitador Heidolph de velocidad variable.

Módulo de membrana:

El módulo de membrana de filtración tangencial empleado es de Pall Filtron (Northborough, Estados Unidos). Su peso molecular de corte es de 3000 Da, con un área filtrante de 0.07 m². El cassette está construido en múltiples capas de membrana que proporcionan la turbulencia precisa en el flujo del fluido a través de la superficie para evitar la concentración por polarización. El material es polietersulfona (PES) especialmente modificada para minimizar la absorción de proteína a la superficie y a la estructura intersticial. La salida se conecta a un rotámetro de 10-100 L/h y éste a su vez al reactor mediante tubo Tygon Masterflex y el permeado (producto) se recoge en un depósito graduado.

Medida y control de la presión transmembrana:

La fuerza impulsora para el flujo de filtrado a través de la membrana es la presión transmembrana, P_T , definida por Cheryan (1986):

$$P_T = \frac{P_e + P_s}{2} - P_f \quad [4.9]$$

donde P_e = presión de entrada

P_s = presión de salida

P_f = presión del filtrado.

Puesto que se suele trabajar con el filtrado abierto, P_f es despreciable, resultando:

$$P_T = \frac{P_e + P_s}{2} \quad [4.10]$$

Las presiones son medidas por 3 manómetros con un rango de 0-60 psi. Los valores de P_e y P_s son controlados variando la velocidad de la bomba de recirculación y mediante una válvula instalada en la línea de retenido.

4.5.2. Limpieza del módulo de membrana.

Una vez terminado el proceso de filtración o si se ha producido un descenso inadmisibles en el flujo de filtrado se procede a la limpieza de la membrana según el siguiente protocolo establecido para el módulo utilizado en esta investigación.

- Desalojar producto con agua desionizada con el filtrado cerrado hasta apreciar salida clara.
- Recircular NaOH 0.25 M a 30 °C a una presión superior a 10 psi durante 15 minutos.
- Abrir el filtrado y reponer NaOH 0.25 M a 30 °C nueva. Recircular durante 1 hora.
- Cerrar el filtrado y pasar agua desionizada hasta que el retenido sea neutro.
- Recircular agua desionizada con el filtrado abierto hasta apreciar filtrado neutro.

Si tras este ciclo no se recupera el flujo inicial de filtrado con agua, se recircula durante 30 minutos una disolución de Protex 6L al 0.1-0.5 % a 50 °C y pH = 8.5 y se mantiene la membrana en la misma disolución durante toda la noche. A continuación se repiten los pasos 4 y 5.

Si aún así no se obtiene el flujo deseado, se recircula durante 30 minutos una disolución de NaOH 0.5 N conteniendo 300 ppm de NaClO a 30 °C. Se enjuaga seguidamente con agua desionizada, etapas 4 y 5.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Determinación del peso molecular medio y moles de enlaces del sustrato.

El peso molecular medio del sustrato se calcula a partir de su distribución de pesos moleculares analizada por cromatografía líquida, sección 4.3.7, en las condiciones de operación pH = 8.5 y T = 50 °C, Figura 6.

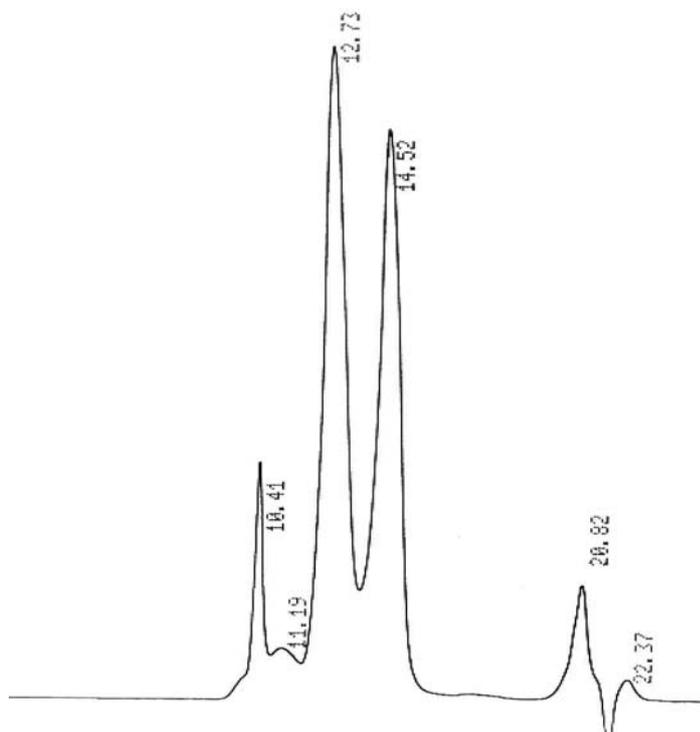


Figura 6. Cromatograma del sustrato al 1 %, pH = 8.5 y T = 50 °C

El área relativa de cada pico y su tiempo de retención, que se relaciona como ya se ha mencionado en la sección *Materiales y métodos* con el peso molecular, aparecen en la Tabla 12.

Tabla 12. Integración del cromatograma del sustrato.

Pico	Area (%)	t _R (min)	PM (Da)
1	6.584	10.41	44405
2	3.296	11.19	34352
3	44.520	12.73	20695
4	33.431	14.52	11483
5	8.974	20.82	215
6	3.195	22.37	65

El peso molecular medio, PM_m , se calcula como una media ponderada según el área de cada uno de los picos obtenidos:

$$PM_m = \frac{\sum_i PM_i A_i}{\sum_i A_i} = 17130 \quad [5.1]$$

El peso molecular medio por aminoácido en el sustrato, PM_A , se determina a través del análisis del contenido, C , en aminoácidos obtenido según el proceso indicado en la sección *Materiales y métodos*, Tabla 13.

$$PM_A = \frac{\sum_i PM_i C_i}{\sum_i C_i} = 114.8 \quad [5.2]$$

De esta forma, el número medio de enlaces por cadena peptídica en la proteína nativa, n_0 , puede estimarse en:

$$n_0 = \frac{PM_m}{PM_A} - 1 = \frac{17130}{114.8} - 1 \approx 148 \quad [5.3]$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 13. Aminograma del sustrato.

Símbolo	Aminoácido	PM	PM _i =PM-18	C (%)
Ala	Alanina	89.1	71.1	5.4
Arg	Arginina	174.2	156.2	2.1
Asp	Acido aspártico	133.1	115.1	7.4
Cys	Cisteína	121.1	103.1	1.3
Glu	Acido glutámico	147.1	129.1	19
Gly	Glicina	75.1	57.1	3.4
His	Histidina	155.2	137.2	1.6
Ile	Isoleucina	131.2	113.2	5.4
Leu	Leucina	131.2	113.2	8.6
Lys	Lisina	146.2	128.2	8.9
Met	Metionina	149.2	131.2	2.0
Phe	Fenilalanina	165.2	147.2	4.3
Pro	Prolina	115.1	97.1	5.8
Ser	Serina	105.1	87.1	5.1
Thr	Treonina	119.1	101.1	6.6
Trp	Triptófano	204.2	186.2	2.1
Tyr	Tirosina	181.2	163.2	2.5
Val	Valina	117.1	99.1	8.5

Así, los moles de enlaces peptídicos por gramo de proteína, h_T , serán:

$$h_T = \frac{n_0}{PM_m} = \frac{148}{17130} = 0.0088 \quad [5.4]$$

5.2. Selección de la enzima.

Los resultados obtenidos en la hidrólisis de las proteínas del lactosuero con cada una de las enzimas comerciales ensayadas, en las condiciones óptimas de pH y T de estas enzimas, se resumen en el Apéndice 9.2 y se muestran en la Figura 7.

Se observa que la enzima de origen animal PEM 2500S presenta la mayor actividad inicial, pero que ésta decae bruscamente a partir de los 20 minutos de reacción.

Es la enzima bacteriana Protex 6 L la que mantiene una elevada actividad durante todo el proceso, consiguiendo los mayores rendimientos, por lo que es la enzima seleccionada para la hidrólisis de nuestro sustrato.

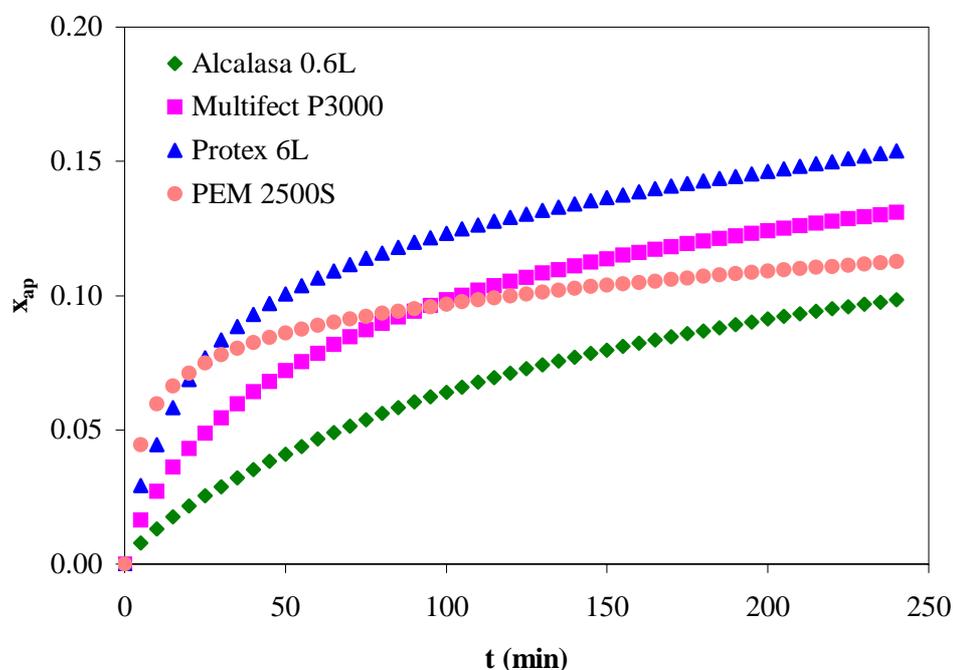


Figura 7. Hidrólisis de proteínas del lactosuero con diferentes enzimas comerciales. $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $T = 50$ °C, $pH_{bacterianas} = 8.5$, $pH_{animal} = 8.0$

En la Figura 8 se muestra el diagrama de Richardson, representación tridimensional, de la subtilisina Protex 6L.

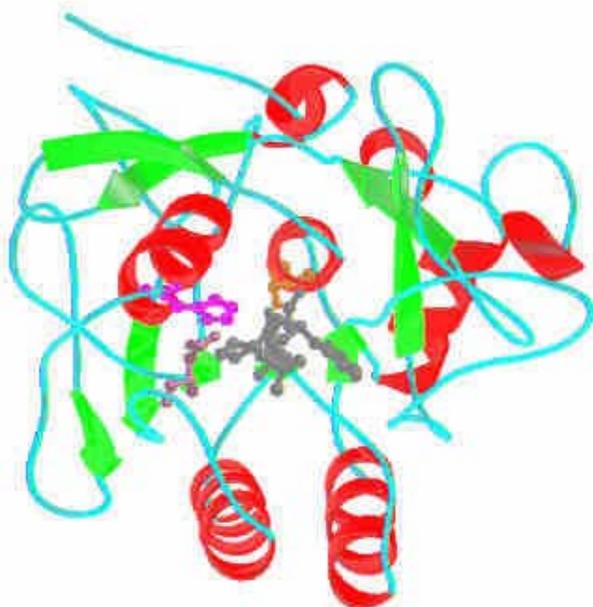


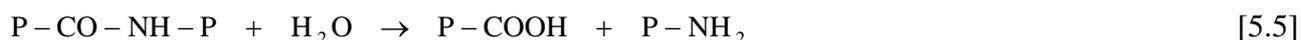
Figura 8. Diagrama de Richardson de Protex 6L.

5.3. Cálculo del grado de hidrólisis.

5.3.1. Aspectos teóricos.

5.3.1.1. Grado de hidrólisis y consumo de base.

Cuando se hidroliza un enlace amido a pH alcalino, $7 < \text{pH} < 10$,



el grupo carboxilo terminal se disocia por completo



y los protones formados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonización de los grupos α -amino liberados:



es decir, que por cada mol de enlaces amido hidrolizados surge un mol de aniones monovalentes, P-COO^- , y un mol de cationes monovalentes repartido entre las dos especies: P-NH_3^+ y H^+ . La base agregada para mantener constante el pH neutraliza únicamente los protones, que son sustituidos por el catión de la base, por tanto los moles de base añadida son equivalentes a los protones generados por la hidrólisis, que es sólo una fracción de los enlaces amido hidrolizados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El equilibrio de la ecuación [5.7], que puede considerarse instantáneo ya que sólo implica el intercambio de un protón, permite calcular la fracción de los enlaces amido hidrolizados que debe ser neutralizada por la base para mantener constante el pH, y por tanto relacionar el consumo de base con el grado de hidrólisis. En efecto, debe cumplirse

$$\frac{[P-NH_2][H^+]}{[P-NH_3^+]} = K \quad [5.8]$$

siendo K la constante del equilibrio de desprotonización del grupo amino, introduciendo en la ecuación [5.8] los valores de

$$K = 10^{-pK} \quad [H^+] = 10^{-pH} \quad [5.9]$$

queda

$$\frac{[P-NH_2]}{[P-NH_3^+]} = 10^{pH-pK} \quad [5.10]$$

y la fracción buscada será

$$\frac{[P-NH_2]}{[P-NH_2] + [P-NH_3^+]} = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad [5.11]$$

por tanto la relación entre los moles de enlaces amido hidrolizados y los moles de base añadida vendrá dada

$$M_X = \frac{1 + 10^{pH-pK}}{10^{pH-pK}} M_B = (1 + 10^{pK-pH}) M_B \quad [5.12]$$

por lo que para evaluar el grado de hidrólisis es preciso conocer el valor del pK indicado.

Sin embargo, la ecuación [5.10] debe implicar un promedio de los diferentes grupos \forall -amino liberados en la hidrólisis parcialmente protonizables al pH considerado



Para el equilibrio [5.13] la ecuación [5.10] deberá escribirse en la forma

$$\frac{[P_i NH_2]}{[P_i NH_3^+]} = 10^{pH-pK_i} \quad [5.14]$$

con lo que si se denomina C_i a los moles/L liberados de $P_i NH_2$, libre o protonado, se cumplirá

$$[P_iNH_2] + [P_iNH_3^+] = [P_iNH_3^+](1 + 10^{pH-pK_i}) = C_i \quad [5.15]$$

por tanto la concentración de la forma protonada

$$[P_iNH_3^+] = \frac{C_i}{(1 + 10^{pH-pK_i})} \quad [5.16]$$

sumando las ecuaciones [5.16] para todos los grupos liberados

$$[P-NH_3^+] = \sum_i [P_iNH_3^+] = \sum_i \frac{C_i}{(1 + 10^{pH-pK_i})} \quad [5.17]$$

y puesto que la concentración de la forma protonada de todos los grupos \forall -amino liberados utilizando el pK medio definido por [5.10] es

$$[P-NH_3^+] = \frac{C_T}{(1 + 10^{pH-pK})} \quad [5.18]$$

siendo C_T los moles/L totales de enlaces amido hidrolizados, la comparación de las ecuaciones [5.17] y [5.18] pone de manifiesto que el valor medio del pK adecuado viene dado por la expresión

$$pK = pH - \log_{10} \left(\frac{1}{\sum_i \frac{C_i / C_T}{1 + 10^{pH-pK_i}}} - 1 \right) \quad [5.19]$$

ecuación que demuestra que el valor del pK medio depende del pH de trabajo.

5.3.1.2. Grado de hidrólisis y descenso crioscópico.

Como es sabido, el descenso de la temperatura de congelación de una solución, ΔT , está relacionado con la molalidad de la misma, m , por la siguiente ecuación:

$$\Delta T = K_f \phi m \quad [5.20]$$

donde K_f es 1.86 K/molal para agua y ϕ es el coeficiente osmótico, el cual en disoluciones diluidas puede calcularse aplicando la Ley límite de Debye-Hückel:

$$\phi = 1 - A_\phi \left| z^+ z^- \right| \sqrt{I} \quad [5.21]$$

donde I es la fuerza iónica y A_ϕ un coeficiente función de la temperatura.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las especies presentes en cada momento durante la hidrólisis de proteínas a pH y T constantes, la molalidad de los péptidos (moles de péptidos/kg de agua) será:

$$m_0 + s_0 h_T x \quad [5.22]$$

y la molalidad de la base añadida para mantener constante el pH:

$$\frac{s_0 h_T x}{1 + 10^{pK-pH}} \quad [5.23]$$

Así, el coeficiente osmótico y la molalidad vendrán dados por:

$$\phi = 1 - A_\phi \sqrt{b_0 + \frac{s_0 h_T x}{1 + 10^{pK-pH}}} \quad [5.24]$$

$$m = m_0 + i_0 + b_0 + s_0 h_T x \left(\frac{2 + 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}} \right) \quad [5.25]$$

donde s_0 = gramos de proteína iniciales / kg de agua

h_T = moles de enlaces peptídicos / g de proteína nativa

b_0 = molalidad inicial de la base añadida para ajustar el pH al pH de hidrólisis

m_0 = molalidad inicial de la proteína

i_0 = molalidad del resto de especies (azúcares, sales, etc.)

x = fracción de enlaces peptídicos hidrolizados, grado de hidrólisis.

Por tanto,

$$\Delta T = K_f \left(1 - A_\phi \sqrt{b_0 + \frac{s_0 h_T x}{1 + 10^{pK-pH}}} \right) \left(m_0 + i_0 + b_0 + s_0 h_T x \left(\frac{2 + 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}} \right) \right) \quad [5.26]$$

expresión que permite calcular el grado de hidrólisis alcanzado por medidas del descenso del punto de congelación conocidos A_ϕ , h_T , m_0 , i_0 , b_0 y el pK medio de los grupos α -amino liberados en el proceso hidrolítico.

5.3.1.3. Distribución de los pK_i .

Cuando se produce la hidrólisis enzimática de una proteína con una enzima específica, es de esperar que ésta catalice especialmente la rotura de enlaces péptidos en los que intervenga un determinado

aminoácido o un grupo de aminoácidos semejantes, sin embargo el pK del grupo α -amino liberado estará afectado por la naturaleza de los aminoácidos más próximos al que ha quedado formando parte del grupo amino terminal, lo que determinará una variación en un cierto intervalo de los pK_i de los grupos α -amino liberados. Si se supone una distribución normal centrada en μ y con una desviación estándar σ , la fracción de los grupos α -amino liberados con un valor del pK comprendido entre pK y pK+dpK será

$$\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \exp\left(-\frac{(\text{pK} - \mu)^2}{2\sigma^2}\right) d\text{pK} \quad [5.27]$$

Para esta distribución continua el sumatorio que aparece en la ecuación [5.19], y que representa la fracción protonada de los grupos α -amino liberados por la hidrólisis, debe transformarse en una integral

$$\sum_i \frac{C_i / C_T}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_i}} = \int_0^\infty \frac{\exp\left(-\frac{(\text{pK} - \mu)^2}{2\sigma^2}\right)}{\sqrt{2\pi\sigma^2} (1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}})} d\text{pK} \quad [5.28]$$

que puede evaluarse a cualquier valor del pH, para valores dados de los dos parámetros que caracterizan la distribución (μ y σ) y utilizando la ecuación [5.19] determinar el valor medio del pK adecuado. A título de ejemplo, en la Figura 9 y Figura 10, se muestran los resultados obtenidos por este procedimiento utilizando el programa MatLab para unas distribuciones de $\mu = 7.0$, $\sigma = 0.5$ y $\mu = 8.0$, $\sigma = 0.2$, respectivamente.

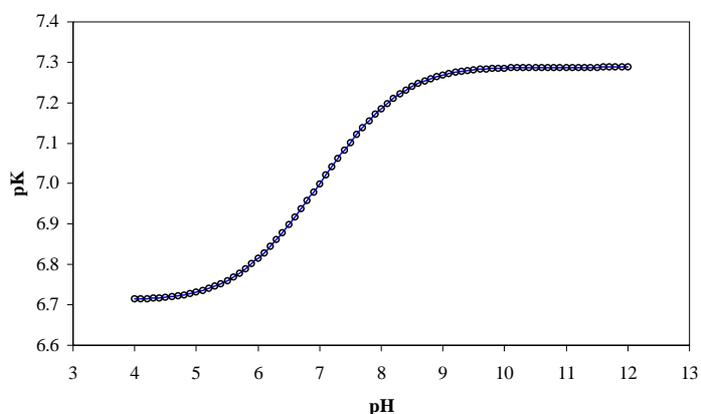


Figura 9. Variación del pK con el pH determinado mediante las ecuaciones [5.19] y [5.28] para $\mu=7.0$ y $\sigma=0.5$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

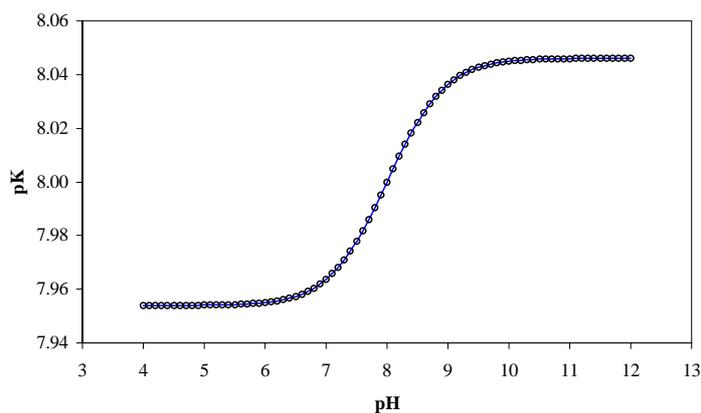


Figura 10. Variación del pK con el pH determinado mediante las ecuaciones [5.19] y [5.28] para $\mu=8.0$ y $\sigma=0.2$

Si estamos interesados en el rango de pH que determina una fracción protonada entre 0.95 y 0.05, podemos calcular dicho rango usando la ecuación [5.27], dependiendo su tamaño únicamente de la anchura de la distribución, σ , y su centro, μ . En la Tabla 14 aparecen los valores obtenidos en este cálculo. Fuera de este rango, puede aceptarse que todos los grupos α -amino liberados están protonados (a pHs bajos) o desprotonados (a pHs altos). Mediante la ecuación [5.19] podemos llegar al valor correcto del pK medio dentro de este rango.

Tabla 14. Rango de pH usado para calcular los valores de pK mediante las ecuaciones [5.19] y [5.28].

σ	Intervalos de pH
0.2	$\mu \pm 6.6 \sigma$
0.4	$\mu \pm 3.6 \sigma$
0.6	$\mu \pm 2.7 \sigma$
0.8	$\mu \pm 2.3 \sigma$
1.0	$\mu \pm 2.1 \sigma$
1.2	$\mu \pm 2.0 \sigma$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

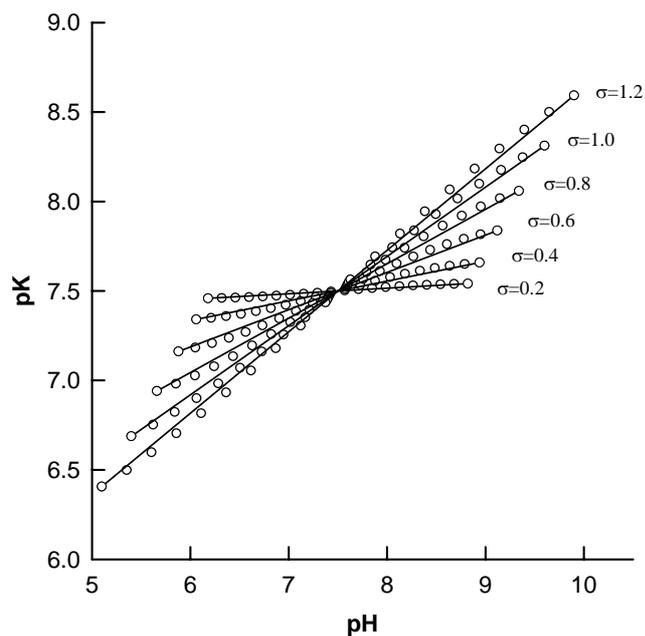


Figura 11 Variación del pK medio con el pH en el rango lineal para $\mu = 7.5$

Algunos de los resultados obtenidos con este procedimiento aparecen en la Figura 11, para distribuciones con $\mu = 7.5$ y valores de σ entre 0.2 y 1.2.

Se observa que los valores de pK dependen linealmente del pH en el rango en cuestión.

Los resultados para $\mu = 7.0$ y valores de σ entre 0.2 y 1.2 se recogen en la Tabla 15.

Tabla 15. pK frente a pH: parámetros de regresión lineal para $\mu = 7.0$. Resultados del ajuste en el rango lineal.

σ	Pendiente	Ordenada en el origen (i)	r^2	$(\mu-i)/\mu$
0.20	0.0357	6.7504	0.9855	0.0357
0.40	0.1231	6.1387	0.9912	0.1230
0.60	0.2265	5.4146	0.9952	0.2265
0.80	0.3235	4.7355	0.9973	0.3235
1.00	0.4061	4.1571	0.9983	0.4061
1.20	0.4741	3.6813	0.9989	0.4741

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pendientes de las rectas y los coeficientes de regresión, r^2 , no dependen del valor de μ , siendo los ajustes satisfactorios en todos los casos. Dado que todas las rectas pasan por el punto (μ, μ) , la ordenada en el origen viene determinada por los valores de μ y de la pendiente, de tal forma que, en el rango en cuestión, la relación entre el pK medio adecuado y el pH viene dada por:

$$pK = \mu + a(pH - \mu) \quad [5.29]$$

El valor del parámetro a depende exclusivamente de la desviación estándar de la distribución. En la Figura 12 se muestra esta dependencia ajustada en el intervalo considerado, a la expresión:

$$a = \frac{0.956 \sigma^2}{1 + 1.353 \sigma^{1.872}} \quad [5.30]$$

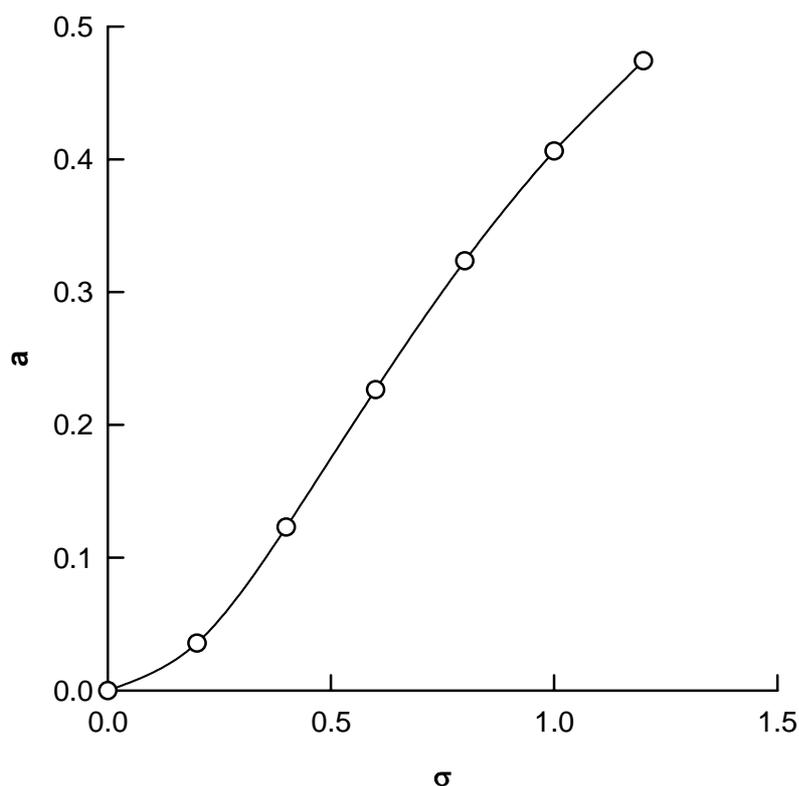


Figura 12. Variación de la pendiente de la ecuación [5.29] frente a σ .

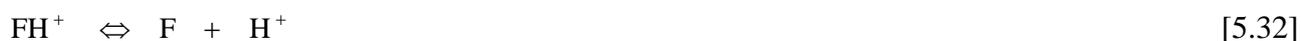
Por tanto, si aceptamos que los pK_i de los grupos α -amino liberados pueden representarse mediante una función continua, caracterizada por su valor medio, μ , y su desviación estándar, σ , los valores de pK medio varían con el pH según una línea recta:

$$pK = \mu + a(pH - \mu) = \mu + \frac{0.956 \sigma^2}{1 + 1.353 \sigma^{1.872}} (pH - \mu) \quad [5.31]$$

5.3.1.4. Determinación del pK medio.

Para determinar el pK medio del proceso de hidrólisis de un sistema proteína-enzima dado, podemos utilizar el siguiente procedimiento basado en la valoración en rango alcalino de la proteína nativa y de la proteína parcialmente hidrolizada.

Cuando se valora con una base una disolución que contiene grupos protonizables, englobando todos estos grupos en F, el equilibrio



determinará la variación del pH con la base añadida. Este equilibrio puede expresarse en la forma:

$$\frac{[F]}{[FH^+]} = 10^{pH - pK} \quad [5.33]$$

donde el valor medio adecuado del pK vendrá dado por la ecuación [5.19].

La aplicación de la ecuación [5.33] en el momento inicial de la valoración dará

$$\frac{[F]_0}{[FH^+]_0} = 10^{pH_0 - pK_0} \quad [5.34]$$

por lo que

$$[FH^+]_0 = \frac{C_F}{1 + 10^{pH_0 - pK_0}} \quad [5.35]$$

siendo C_F la concentración total de F, en forma libre o protonada.

Cuando a un volumen inicial V_0 de la disolución se le ha añadido un volumen V_B de base de concentración C_B , los OH^- se habrán consumido en parte neutralizando protones y desplazando el equilibrio [5.32] y el resto quedará libre modificando el pH de la disolución, y debe seguir cumpliéndose la ecuación [5.33] aunque con el valor del pK medio correspondiente al nuevo pH

$$\frac{V_0 [F]_0 + V_B C_B - ((V_0 + V_B) 10^{-pOH} - V_0 10^{-pOH_0})}{V_0 [FH^+]_0 - V_B C_B + ((V_0 + V_B) 10^{-pOH} - V_0 10^{-pOH_0})} = 10^{pH - pK} \quad [5.36]$$

introduciendo

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$b = V_B C_B / V_0 - ((1 + V_B / V_0) 10^{\text{pH}-\text{pI}} - 10^{\text{pH}_0-\text{pI}}) \quad [5.37]$$

siendo pI el producto iónico del agua a la temperatura considerada, la ecuación [5.36] queda en la forma

$$\frac{[F]_0 + b}{[FH^+]_0 - b} = 10^{\text{pH}-\text{pK}} \quad [5.38]$$

Sustituyendo en [5.38] las ecuaciones [5.34] y [5.35]

$$\frac{C_F 10^{\text{pH}_0-\text{pK}_0}}{1 + 10^{\text{pH}_0-\text{pK}_0}} + b = \frac{C_F 10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}_0-\text{pK}_0}} - b 10^{\text{pH}-\text{pK}} \quad [5.39]$$

que puede reagruparse en:

$$b = C_F \left(\frac{1}{1 + 10^{\text{pK}-\text{pH}}} - \frac{1}{1 + 10^{\text{pK}_0-\text{pH}_0}} \right) \quad [5.40]$$

Hay que tener en cuenta que cuando se valora una disolución de la proteína en su estado nativo por adición de base en el rango alcalino partiendo de un pH inicial, pH_0 , los equivalentes/L de base consumidos en el desplazamiento del equilibrio de protonización calculados con la ecuación [5.37], b_s , están lógicamente relacionados con el pH alcanzado. Sin embargo, en este caso intervienen todos los grupos protonizables de la proteína, terminales o no, que son distintos de los grupos ∇ -amino que se liberan en la hidrólisis. Si para la misma concentración y pH de partida se valora una disolución de la proteína parcialmente hidrolizada, los equivalentes/L de base consumidos, b_x , para alcanzar un determinado pH estarán determinados por los grupos protonizables existentes en la proteína de partida más los que han aparecido como consecuencia de la hidrólisis.

Es decir, que la diferencia, $b_x - b_s$, corresponde a la valoración de los grupos protonizables aparecidos como consecuencia de la hidrólisis. Por tanto, si en la ecuación [5.40] utilizamos $b = b_x - b_s$, el parámetro C_F debe corresponder a la concentración total de grupos ∇ -amino liberados por la hidrólisis.

Esta concentración puede evaluarse por

$$C_F = s_0 h_T x \quad [5.41]$$

siendo s_0 los g/L de proteína, h_T los equivalentes de enlaces péptidos por g de proteína y x el grado de hidrólisis del hidrolizado utilizado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la relación encontrada entre el número de moles de enlaces amido hidrolizados y el consumo de base necesario para mantener constante el pH durante el proceso de hidrólisis, ecuación [5.12].

$$M_x = (1 + 10^{pK-pH}) M_B$$

el grado de hidrólisis, x , vendrá dado por

$$x = \frac{(1 + 10^{pK-pH}) M_B}{M_p h_T} \quad [5.42]$$

y C_F podrá evaluarse

$$C_F = \frac{V_{BH} N_{BH} (1 + 10^{pK_H - pH_H})}{V_0} \quad [5.43]$$

siendo V_{BH} = volumen de base consumida en la hidrólisis para mantener constante el pH

N_{BH} = normalidad de la base empleada

pH_H = pH al que se realiza la hidrólisis

pK_H = valor del pK medio adecuado al pH de la hidrólisis

V_0 = volumen de la disolución de hidrolizado.

Con todo esto, la ecuación [5.40] puede reescribirse de la forma

$$b_x - b_s = \frac{V_{BH} N_{BH}}{V_0} \left(\frac{1 + 10^{pK_H - pH_H}}{1 + 10^{pK-pH}} - \frac{1 + 10^{pK_H - pH_H}}{1 + 10^{pK_0 - pH_0}} \right) \quad [5.44]$$

Para $pH = pH_H$:

$$(b_x - b_s)_{pH=pH_H} = (b_x - b_s)_H = \frac{V_{BH} N_{BH}}{V_0} \left(1 - \frac{1 + 10^{pK_H - pH_H}}{1 + 10^{pK_0 - pH_0}} \right) \quad [5.45]$$

Por tanto

$$\frac{(b_x - b_s)}{(b_x - b_s)_H} = \frac{(1 + 10^{pK_H - pH_H}) \left(\frac{1 + 10^{pK_0 - pH_0}}{1 + 10^{pK-pH}} \right) - (1 + 10^{pK_H - pH_H})}{(1 + 10^{pK_0 - pH_0}) (1 + 10^{pK_H - pH_H})} \quad [5.46]$$

que reordenando queda en la forma

$$\frac{(b_x - b_s)}{(b_x - b_s)_H} = \frac{\left(\frac{1 + 10^{pK_0 - pH_0}}{1 + 10^{pK - pH}} - 1 \right)}{\left(\frac{1 + 10^{pK_0 - pH_0}}{1 + 10^{pK_H - pH_H}} - 1 \right)} \quad [5.47]$$

Si se admite que el pK medio puede expresarse mediante la ecuación [5.31], los exponentes de la ecuación [5.47] vendrán dados por

$$pK - pH = (1 - a)(\mu - pH) = \left(1 - \frac{0.956 \sigma^2}{1 + 1.353 \sigma^{1.872}} \right) (\mu - pH) \quad [5.48]$$

$$pK_0 - pH_0 = (1 - a)(\mu - pH_0) = \left(1 - \frac{0.956 \sigma^2}{1 + 1.353 \sigma^{1.872}} \right) (\mu - pH_0) \quad [5.49]$$

$$pK_H - pH_H = (1 - a)(\mu - pH_H) = \left(1 - \frac{0.956 \sigma^2}{1 + 1.353 \sigma^{1.872}} \right) (\mu - pH_H) \quad [5.50]$$

Las ecuaciones [5.47], [5.48], [5.49] y [5.50] pueden utilizarse para obtener por regresión no lineal, a partir de los datos experimentales de valoración de un hidrolizado, $(b_x - b_s)$ frente a pH, los valores de los parámetros μ y σ y por tanto el valor del pK.

Un factor que podría ejercer alguna influencia es que la ecuación [5.10] debería ser formulada estrictamente en la forma:

$$\frac{[P - NH_2] \gamma_1}{[P - NH_3^+] \gamma_2} = 10^{pH - pK} \quad [5.51]$$

donde γ_1 es el coeficiente de actividad de las especies libres P-NH₂, y γ_2 es el coeficiente de actividad de las especies protonadas. Hay que tener en cuenta que el electrodo de pH mide la actividad de H⁺. Si los efectos de ambos coeficientes de actividad no se compensan completamente entre sí, ambos serán fundamentalmente función de la fuerza iónica del medio, la cual es alterada por la concentración de proteína y el pH (que determina la carga total de las especies en cuestión) e incluso por la adición de base requerida para mantener el pH constante. Por tanto, podemos observar cualquier posible influencia de los coeficientes de actividad modificando intencionadamente la fuerza iónica de la disolución, por ejemplo, diluyendo o añadiendo una disolución salina y comprobando si el pH cambia de forma apreciable.

5.3.2. Cálculo experimental del pK medio para el sistema WPC-Protex 6L.

Como se ha demostrado, para la medida del grado de hidrólisis de una disolución de proteínas mediante el consumo de base necesario para mantener el pH constante durante el proceso, o mediante el descenso del punto de congelación, es necesario conocer el valor del pK medio de los grupo α -amino hidrolizados.

Para determinar la influencia de los coeficientes de actividad en la ecuación [5.51] se han realizado dos series diferentes de experimentos. En la primera serie, la fuerza iónica fue modificada diluyendo una disolución de proteína de 150 g/L a 100 g/L y posteriormente a 50 g/L. En la segunda serie, la fuerza iónica fue modificada añadiendo consecutivamente 0.75, 6.75 y 67.5 mL de KCl 2 M a 1.5 L de una disolución de proteína a 50 g/L. No se observaron variaciones de pH en ninguna de las dos series de experimentos. Este resultado indica que los coeficientes de actividad se cancelan mutuamente en la práctica.

El procedimiento propuesto para el cálculo del pK será el que se esquematiza a continuación en la Figura 13.

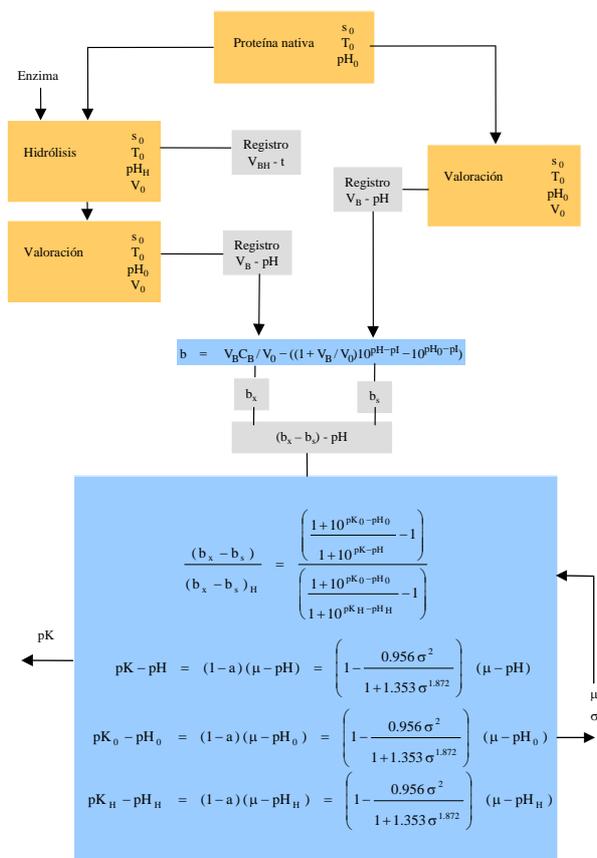


Figura 13. Procedimiento para el cálculo del pK.

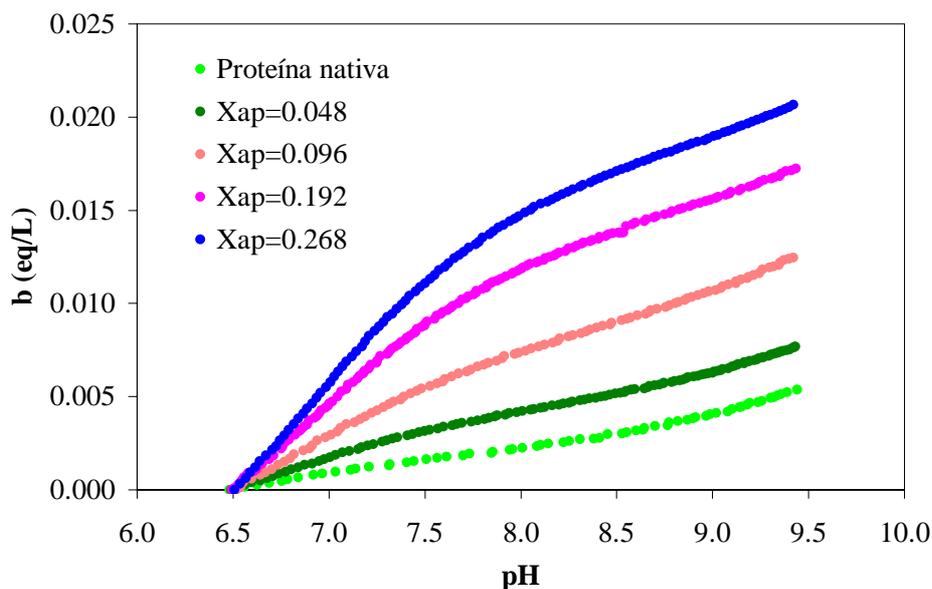


Figura 14. Equivalentes de base consumidos en la valoración de la proteína nativa y parcialmente hidrolizada

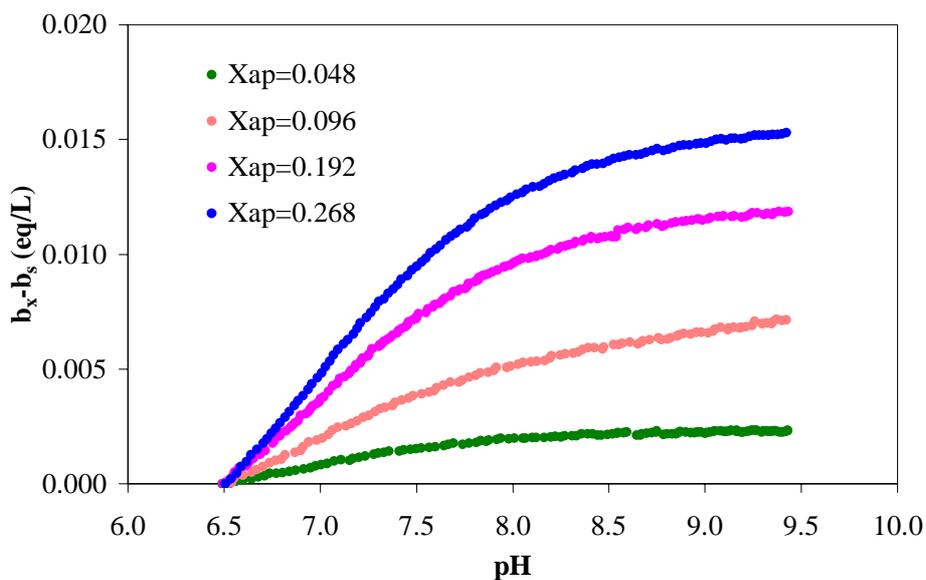


Figura 15. Equivalentes de base consumidos en la hidrólisis.

Los resultados obtenidos en la valoración de los hidrolizados de proteínas séricas con la enzima bacteriana Protex 6L se recogen en el Apéndice 9.3. Los equivalentes/L de base consumidos en el desplazamiento del equilibrio de protonación se han calculado mediante la ecuación [5.37] utilizando el valor del producto iónico del agua a la temperatura del proceso, pI a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ es 13.275. Estos resultados se muestran en la Figura 14 y Figura 15.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Donde x_{ap} es el grado de hidrólisis aparente definido en la ec [4.1]. Como puede observarse, los valores de $b_x - b_s$ tienden a alcanzar un valor máximo prácticamente constante a altos valores de pH, lo que se correspondería con el hecho de que a estos pHs todos los grupos amino ya estarían totalmente desprotonados.

Al dividir los equivalentes/L de base consumidos en el desplazamiento del equilibrio en cada instante por los consumidos al pH al que se realiza la hidrólisis, $pH = 8.5$, observamos que todos los experimentos se unen en una sola curva, Figura 16.

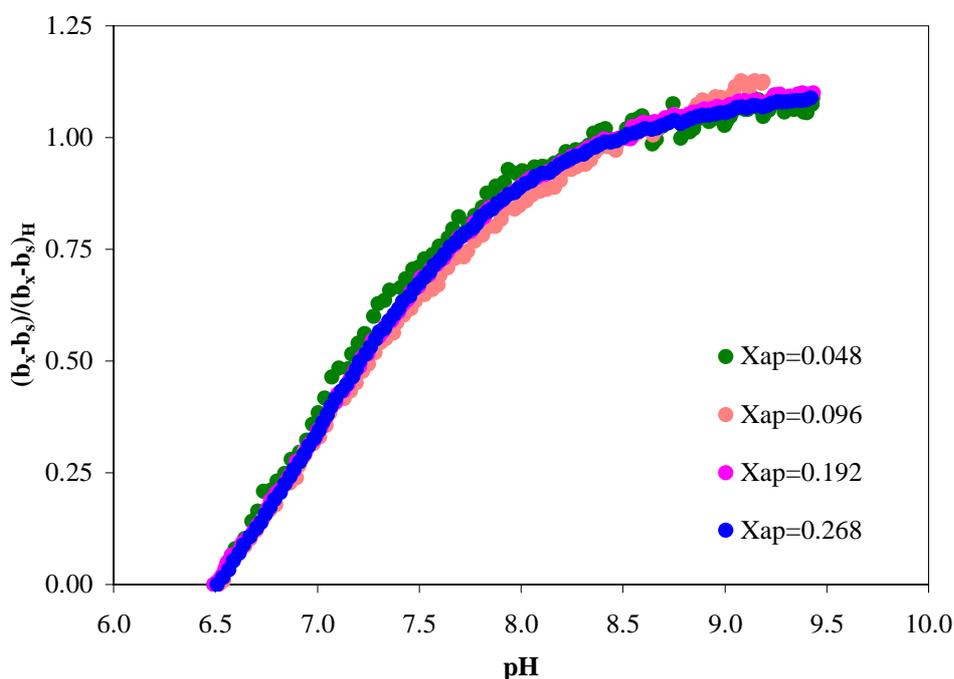


Figura 16. Curvas de valoración normalizadas.

lo que significa que el valor del pK medio es independiente del grado de hidrólisis. Por regresión no lineal de estos datos, se obtienen los valores de μ , a y por tanto de σ :

$$\mu = 6.7820 \quad \forall \quad 0.0252,$$

$$a = 0.3275 \quad \forall \quad 0.0127$$

$$\sigma = 0.8088, \quad r^2 = 0.994$$

De esta forma, para el sistema WPC-Protex 6L:

$$pK = (1 - a)\mu + a \text{ pH} = 4.5609 + 0.3275 \text{ pH} \quad [5.52]$$

y al pH de hidrólisis, de 8.5, resulta $pK = 7.34$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

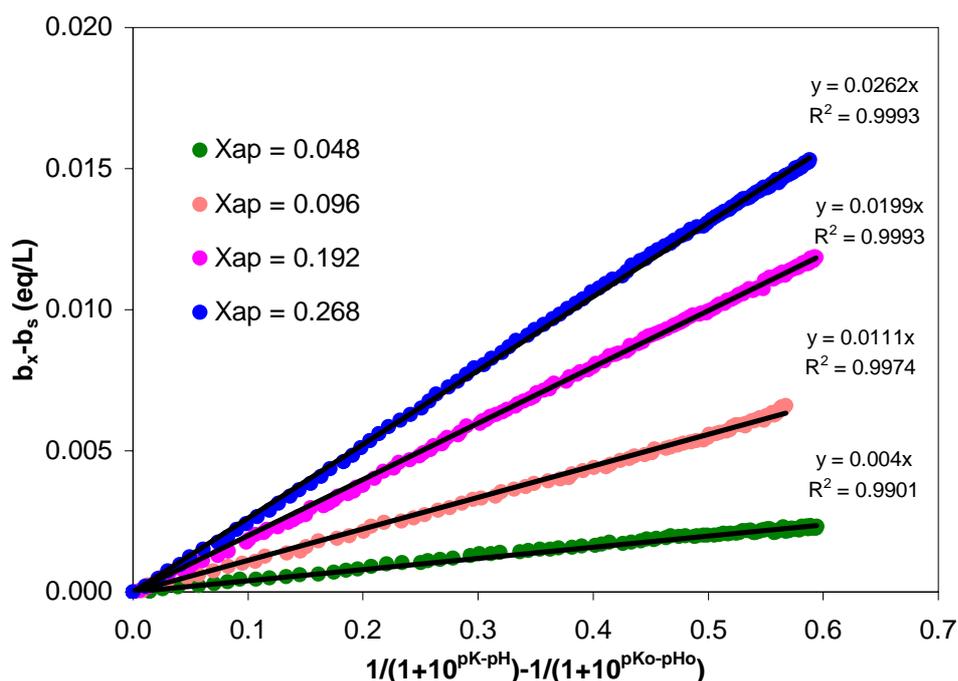


Figura 17. Cálculo de CF según la ecuación [5.40].

Para comprobar la bondad del procedimiento propuesto para el cálculo del pK calcularemos en cada caso la concentración total de grupos α -amino liberados durante la hidrólisis, C_F , por la ecuación [5.40] en la que se utiliza el valor del pK promedio calculado, Figura 17, y por la ecuación [5.43] con los datos experimentales de la hidrólisis.

Los valores de C_F obtenidos se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Valores de C_F .

X_{ap}	x	C_F ec [5.40]	C_F ec [5.43]
0.048	0.051	0.0040	0.0044
0.096	0.102	0.0111	0.0098
0.192	0.205	0.0199	0.0179
0.368	0.287	0.0262	0.0247

Como puede observarse, los valores difieren en menos del 10 %, por lo que la hipótesis de que el pK no varía con el grado de hidrólisis es aceptable y confirma el método de cálculo.

5.3.3. Grado de hidrólisis por consumo de base.

Una vez determinado el pK medio adecuado, el cálculo del grado de hidrólisis a partir del consumo de base necesario para mantener el pH constante se realiza fácilmente, a partir de la siguiente ecuación:

$$x = \frac{V_{BH} N_{BH} (1 + 10^{pK-pH})}{M_p h_T} \quad [5.53]$$

5.3.4. Grado de hidrólisis por descenso crioscópico.

Como se ha demostrado anteriormente, grado de hidrólisis y descenso crioscópico se relacionan mediante la ecuación [5.26]:

$$\Delta T = K_f \left(1 - A_\phi \sqrt{b_0 + \frac{s_0 h_T x}{1 + 10^{pK-pH}}} \right) \left(m_0 + i_0 + b_0 + s_0 h_T x \left(\frac{2 + 10^{pK-pH}}{1 + 10^{pK-pH}} \right) \right)$$

Por lo que para calcular x por medidas de ΔT , además del pK, es necesario conocer los valores de A_ϕ , b_0 , m_0 e i_0 .

Los parámetros s_0 , pH, b_0 y m_0 pueden ser calculados atendiendo a las condiciones del experimento de hidrólisis; K_f y h_T son conocidos, mientras que para determinar A_ϕ e i_0 se precisa una calibración.

Para ello partimos de una disolución de WPC con una concentración de 10 g/L. Con objeto de minimizar el efecto de i_0 , que se corresponde con la concentración molal de especies no proteicas, se lleva a cabo una diafiltración en continuo a través de una membrana de 3 kDa de corte, a una presión transmembrana de 20 psi y a 40 °C para facilitar el flujo de filtrado. En la diafiltración, a medida que obtenemos un filtrado que contiene las especies permeables no deseadas, se añade a la disolución la misma cantidad de agua. La disolución queda así purificada en su fracción proteica.

La fracción de soluto (FSE) eliminado en una diafiltración discontinua (Cheryan, 1986) es:

$$FSE = 1 - \exp(-V_D (1 - r)) \quad [5.54]$$

donde V_D = cociente entre volumen de permeado y volumen inicial

r = retención del soluto.

Teniendo en cuenta que para la lactosa y las sales con una membrana de 3 kDa, la retención es prácticamente nula, se ha empleado un valor de $V_D = 4$, que elimina más del 98 % del soluto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez diafiltrada la disolución de WPC, se comprueba su contenido en nitrógeno y se practica una hidrólisis con Protex 6L a un volumen de 200 mL a 50 °C y pH = 8.5. Se registra el consumo de base para mantener el pH constante para calcular el grado de hidrólisis y poder así realizar la calibración y se toman muestras para medir el punto de congelación del hidrolizado. (Tabla 17).

Tabla 17. Valores de descenso crioscópico y grado de hidrólisis.

x	ΔT (mK)
0.0486	33
0.0740	39
0.0918	43
0.1084	47
0.1308	51
0.1608	58
0.1793	62
0.1912	65

Para este experimento $b_0 = 0.00647$ m y $m_0 = 0.000556$ m. A_ϕ e i_0 se obtienen por regresión no lineal de los valores reflejados en la Tabla 17 a la ecuación [5.26]. De esta forma:

$$A_\phi = 1.4218, i_0 = 0.00574 \text{ m}, r^2 = 0.99$$

Comparando los valores experimentales y los predichos por el modelo, Tabla 18, se comprueba la validez del método propuesto para determinar el grado de hidrólisis por medidas del descenso crioscópico de los hidrolizados.

Tabla 18. Descenso crioscópico experimental y calculado por la ecuación [5.26].

ΔT _{exp} (mK)	ΔT _{calc} (mK)	Error relativo (%)
33	32.9	0.2
39	38.9	0.3
43	43.0	0.1
47	46.7	0.6
51	51.7	-1.3
58	58.2	-0.3
62	62.1	-0.1
65	64.6	0.7

Este método, si bien precisa de una calibración previa, ofrece la posibilidad de calcular el grado de hidrólisis de un hidrolizado dado, sin necesidad de realizar un seguimiento del proceso, lo que lo hace muy útil para controlar la calidad del producto.

5.4. Relación del grado de hidrólisis con otros parámetros.

5.4.1. Nitrógeno soluble.

Puesto que la solubilidad instantánea de un hidrolizado de proteínas es la propiedad fundamental en la práctica industrial, la fracción de nitrógeno soluble sobre nitrógeno total (SN) en ácido tricloroacético es un criterio ampliamente empleado para la caracterización de hidrolizados. Este índice, también a menudo denominado nitrógeno no proteínico (NPN), es una medida de la distribución de pesos moleculares, ya que el ácido tricloroacético precipita esencialmente todas las proteínas y una fracción considerable de polipéptidos. Estos factores hacen que sea interesante correlacionar nitrógeno soluble y grado de hidrólisis.

Para ello se realizó una hidrólisis discontinua a 1.5 L de una disolución de WPC a $s_0 = 50$ g/L, $T = 50$ °C, $pH = 8.5$ empleando Protex 6L como enzima. La reacción se monitoriza mediante el consumo de base (que permite calcular el grado de hidrólisis) y se toman muestras determinándose el nitrógeno soluble (SN) según lo indicado en la sección *Materiales y métodos*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Correspondencia entre grado de hidrólisis y nitrógeno soluble.

x	SN (%)
0.0000	5.41
0.0257	23.10
0.0514	32.13
0.0772	41.51
0.1029	52.71
0.1286	62.45
0.1540	66.42
0.1801	76.89
0.2058	82.31
0.2146	83.03

La expresión adecuada para correlacionar estas variables es la empleada por Margot *et al.* (1994). Estos autores proponen un ajuste polinomial de segundo orden que, en nuestro caso, arroja el resultado:

$$SN = -762.34 x^2 + 517.88 x + 7.3339, \quad r^2 = 0.9963 \quad [5.55]$$

La bondad del ajuste puede apreciarse por el valor del coeficiente de correlación y a la vista de la Figura 18.

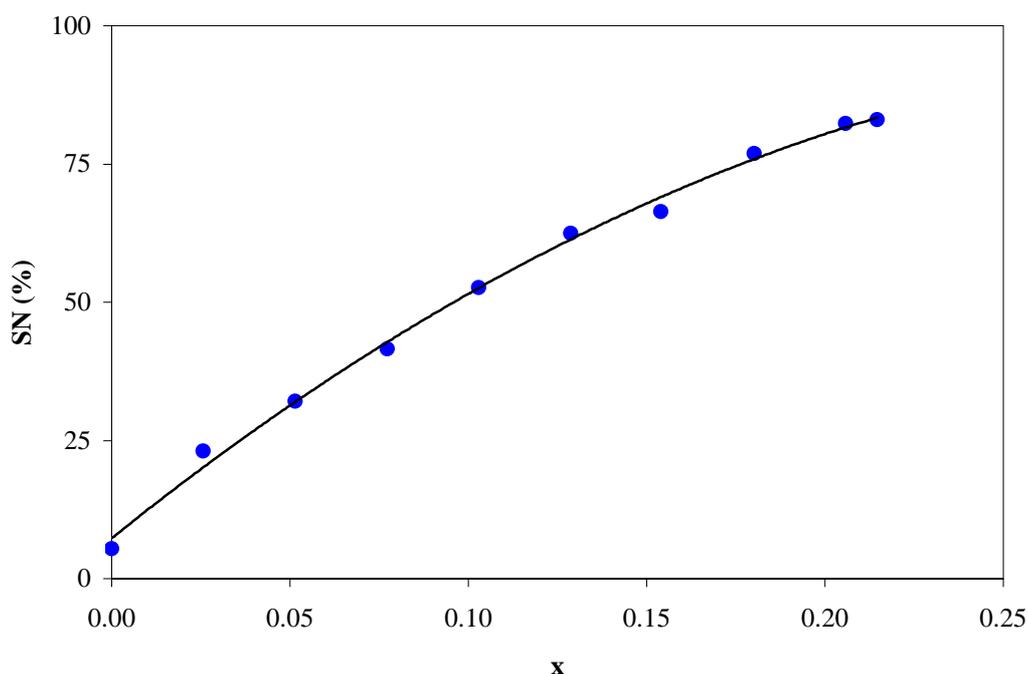


Figura 18. Relación entre grado de hidrólisis y nitrógeno soluble.

Se ha comprobado que SN sólo depende del grado de hidrólisis alcanzado y no de las condiciones de operación.

5.4.2. Peso molecular medio de los péptidos.

Para obtener una relación entre peso molecular medio de los péptidos (PM_x) en un hidrolizado y el propio grado de hidrólisis, es necesario cuantificar los enlaces puestos en juego en el proceso.

Teniendo en cuenta s_0 = concentración inicial de proteína nativa, PM_m = peso molecular medio de la proteína y n_0 = número de enlaces en la proteína, la concentración inicial de enlaces peptídicos será:

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$\frac{s_0 n_0}{PM_m} \quad [5.56]$$

En cualquier instante de la reacción, el número de enlaces rotos/L dependerá del grado de hidrólisis

$$\frac{s_0 n_0}{PM_m} x \quad [5.57]$$

De esta forma, la concentración de péptidos instantánea será igual a la suma de la inicial más la generada por la rotura de enlaces:

$$\frac{s_0}{PM_m} (1 + n_0 x) \quad [5.58]$$

La concentración másica de péptidos se incrementará a lo largo de la hidrólisis ya que por cada enlace roto se incorpora una molécula de agua.

$$s_0 + 18 \frac{s_0 n_0 x}{PM_m} \quad [5.59]$$

Por tanto, el peso molecular medio de los péptidos presentes en el hidrolizado será el cociente entre la masa de péptidos por unidad de volumen y los moles de péptidos por unidad de volumen:

$$PM_x = \frac{s_0 + 18 \frac{s_0 n_0 x}{PM_m}}{\frac{s_0}{PM_m} (1 + n_0 x)} = \frac{1 + 18 h_T x}{\frac{1}{PM_m} + h_T x} \quad [5.60]$$

En la Figura 19 se simula la variación de PM_x con el grado de hidrólisis para la hidrólisis de WPC con Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C.

Es posible comprobar este modelo a través de medidas del descenso crioscópico en el curso de la hidrólisis, ya que

$$\Delta T = K_f \phi m = K_f \phi \left(\frac{m_P}{PM_x m_D} + \frac{V_B N_B}{m_D} + i_0 \right) \quad [5.61]$$

donde m_P y m_D son las masas de proteína y disolvente (agua), respectivamente.

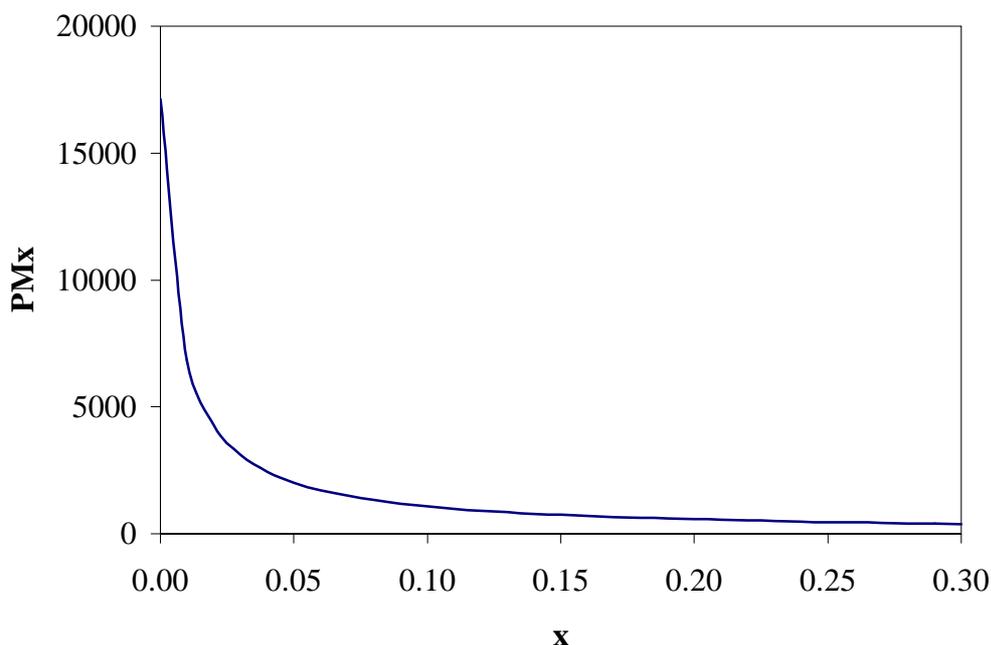


Figura 19. Grado de hidrólisis y peso molecular medio de los péptidos.

Despejando, el peso molecular medio del hidrolizado en función del descenso crioscópico queda:

$$PM_{\Delta T} = \frac{m_p}{\frac{\Delta T m_D}{K_f \phi} - V_B N_B - i_0 m_D} \quad [5.62]$$

donde ϕ es función del grado de hidrólisis según la ecuación [5.24]:

$$\phi = 1 - A_\phi \sqrt{b_0 + \frac{s_0 h_T x}{1 + 10^{pK-pH}}}$$

Se han empleado los resultados del experimento descrito en el apartado 5.3.4 y los datos mostrados en la Tabla 17, que relacionan grado de hidrólisis y descenso crioscópico, para calcular ϕ y $PM_{\Delta T}$. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 20. En la última columna de esta tabla se exponen los valores de los pesos moleculares medios predichos por la ec [5.60] para esos grados de hidrólisis.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 20. Peso molecular de los péptido a través del grado de hidrólisis y del descenso crioscópico.

x	ΔT (mK)	ϕ	$PM_{\Delta T}$ ec[5.62]	PM_x ec[5.60]
0.0486	33	0.8558	1977	2073
0.0740	39	0.8425	1362	1426
0.0918	43	0.8338	1131	1171
0.1084	47	0.8260	954	1004
0.1308	51	0.8161	845	844
0.1608	58	0.8036	668	696
0.1793	62	0.7963	599	629
0.1912	65	0.7917	552	592

Los diferencias entre los valores obtenidos, Figura 20, son inferiores al 7 %, lo que valida la ecuación teórica propuesta, ec [5.60].

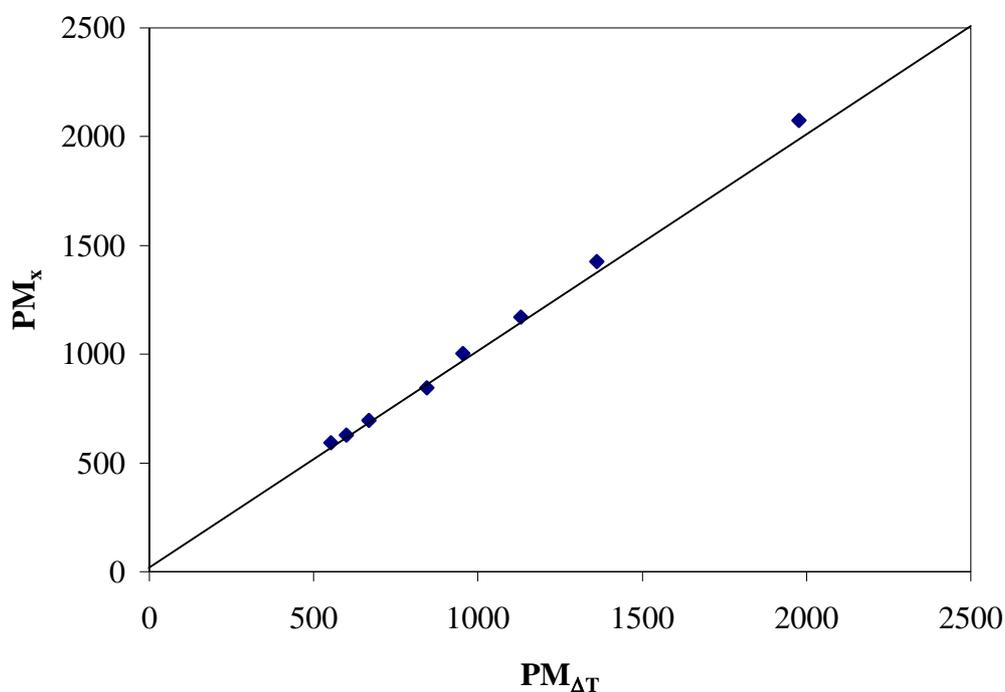


Figura 20. Comparación de los pesos moleculares medios calculados teórica y experimentalmente.

5.4.3. Distribución de pesos moleculares.

La distribución de pesos moleculares de un hidrolizado es útil para predecir la capacidad alergénica del mismo (Knights, 1985), ya que las proteínas de peso molecular comprendido entre 20000-6000 Da son los antígenos más comunes. Las peptonas, con un rango de unos pocos miles de peso molecular, también dan lugar a reacciones anafilácticas en animales sensibilizados. Incluso cuando se trata de péptidos sintéticos aparecen reacciones alergénicas a pesos moleculares del orden de 1500 Da.

También es conocido que la distribución de pesos moleculares en un hidrolizado depende exclusivamente del grado de hidrólisis alcanzado y no de las condiciones de operación (González-Tello *et al.*, 1994).

Por todo ello es interesante estudiar la evolución con el grado de hidrólisis de las siguientes fracciones: $PM > 7000$ Da, $7000 \text{ Da} > PM > 3000$ Da, $3000 \text{ Da} > PM > 1000$ Da y $PM < 1000$ Da. El método utilizado es la técnica de HPLC descrita en el apartado 4.3.7. En la Tabla 21 se indican los porcentajes correspondientes a cada fracción para grados de hidrólisis de hasta un 20 % que se representan en la Figura 21.

Tabla 21. Distribución de pesos moleculares con el grado de hidrólisis.

x	>7000	7000-3000	3000-1000	<1000
0.0000	93.4%	0.4%	0.2%	6.0%
0.0257	59.9%	3.4%	3.0%	33.7%
0.0514	41.9%	9.4%	5.4%	43.3%
0.0772	38.5%	7.8%	7.0%	46.6%
0.1029	17.4%	11.9%	11.0%	59.7%
0.1286	16.5%	7.1%	9.9%	66.6%
0.1540	16.5%	6.7%	9.6%	67.2%
0.1801	16.4%	6.5%	9.3%	67.8%
0.2058	16.4%	5.7%	8.5%	69.4%

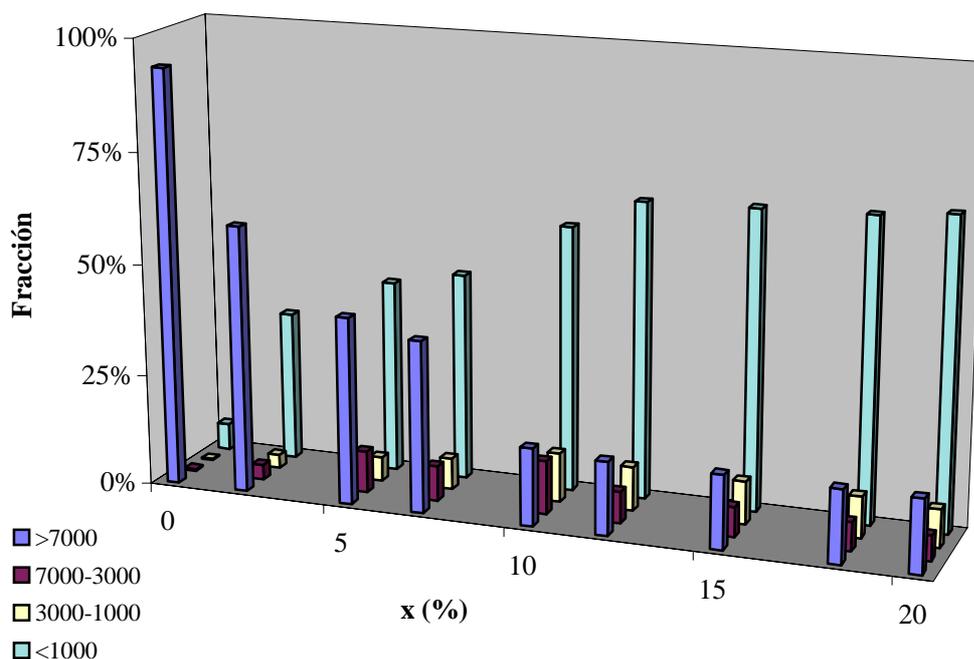


Figura 21. Evolución de los pesos moleculares con el grado de hidrólisis.

La fracción de mayor peso molecular $PM > 7000$ Da, que inicialmente representa el 93 % del hidrolizado disminuye gradualmente con la hidrólisis hasta constituir un 16 % aproximadamente para $x = 0.13$, a partir de aquí la proporción de péptidos mayores a 7 kDa permanece prácticamente constante, lo que sugiere que este porcentaje es resistente a la hidrólisis, al menos, en las condiciones ensayadas.

Las fracciones de 7-3 kDa y de 3-1 kDa, formadas por péptidos de 60-25 y 25-9 aminoácidos, respectivamente, pasa por un máximo a un grado de hidrólisis entorno al 10 %, donde constituyen ambas un 11 % del hidrolizado.

La fracción de peso molecular menor de 1 kDa, aumenta de forma continua durante el proceso de hidrólisis para alcanzar un 70 % del hidrolizado a grados de hidrólisis del 20 %.

5.5. Desactivación de la enzima.

La actividad de la proteasa seleccionada para este estudio, Protex 6L, se ha medido por el ensayo normalizado que se indica en el apartado 4.3.8. La actividad proteolítica, A , se define como los moles de enlaces peptídicos rotos por masa de enzima, M_e , expresada en gramos y puede calcularse por la siguiente expresión:

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$A = \frac{V_B N_B (1 + 10^{pK-pH})}{M_e} \quad [5.63]$$

Se ha estudiado la desactivación de la enzima en presencia (Tabla 22) y ausencia de sustrato (Tabla 23). Para ello se añadía la cantidad adecuada de enzima a un tanque agitado que contenía una disolución de WPC (con sustrato) o una disolución tampón a pH = 8.5 (sin sustrato) y que se mantenía a 50 °C. A intervalos de tiempo, se tomaban muestras de enzima del tanque para determinar su actividad.

Tabla 22. Desactivación de la enzima en presencia de sustrato.

t (min)	A (mol/g)
5	25.18
50	25.09
96	25.18
149	24.80
197	24.21
240	23.99
281	23.83
326	23.70
365	23.49
410	23.19
470	22.81
530	22.39

Para evaluar el efecto que sobre la enzima tiene el esfuerzo mecánico producido por el bombeo en el reactor de membrana, se añadía la enzima al tanque agitado con la disolución tampón a pH = 8.5 y T = 50 °C, que se hacía circular a través de la bomba y retornar al tanque. A determinados tiempos se toman muestras de enzima para realizar el ensayo de actividad correspondiente, cuyo resultado se indica en la Tabla 24. Finalmente, se analizó la adsorción (Tabla 25) y fuga de enzima a través de la membrana. En este caso la disolución tampón a pH = 8.5y 50 °C que contenía la enzima se hacía pasar a través del módulo de membrana funcionando a recirculación total. A los tiempos de estudio requeridos se tomaban muestras tanto del filtrado como del retenido que se sometían al ensayo de actividad descrito anteriormente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 23. Desactivación de la enzima en ausencia de sustrato.

t (min)	A (mol/g)
2	24.12
90	18.39
130	16.57
180	14.80
240	13.11
300	11.81
360	10.63
420	9.74
480	9.02

Tabla 24. Desactivación de la enzima ocasionada por el bombeo.

t (min)	A (mol/g)
3	24.59
60	20.96
120	18.04
180	15.73
240	13.83

Tabla 25. Desactivación de la enzima ocasionada por la membrana.

t (min)	A (mol/g)
4	24.54
71	20.49
147	16.78
227	13.33
301	10.88

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estos resultados, como puede apreciarse en la Figura 22 indican una fuerte desactivación de la enzima en ausencia de sustrato que no se ve incrementada por el efecto del bombeo o de la membrana, por lo que puede afirmarse que la bomba no altera la enzima y que ésta no se adsorbe a la membrana.

La desnaturalización de la enzima responde a una cinética de primer orden con $k_d = 0.0024 \text{ min}^{-1}$ ($r^2 = 0.96$), según se comprueba en la Figura 23.

En presencia de sustrato no hay apenas desactivación debido a que el sustrato estabiliza la enzima impidiendo la autólisis.

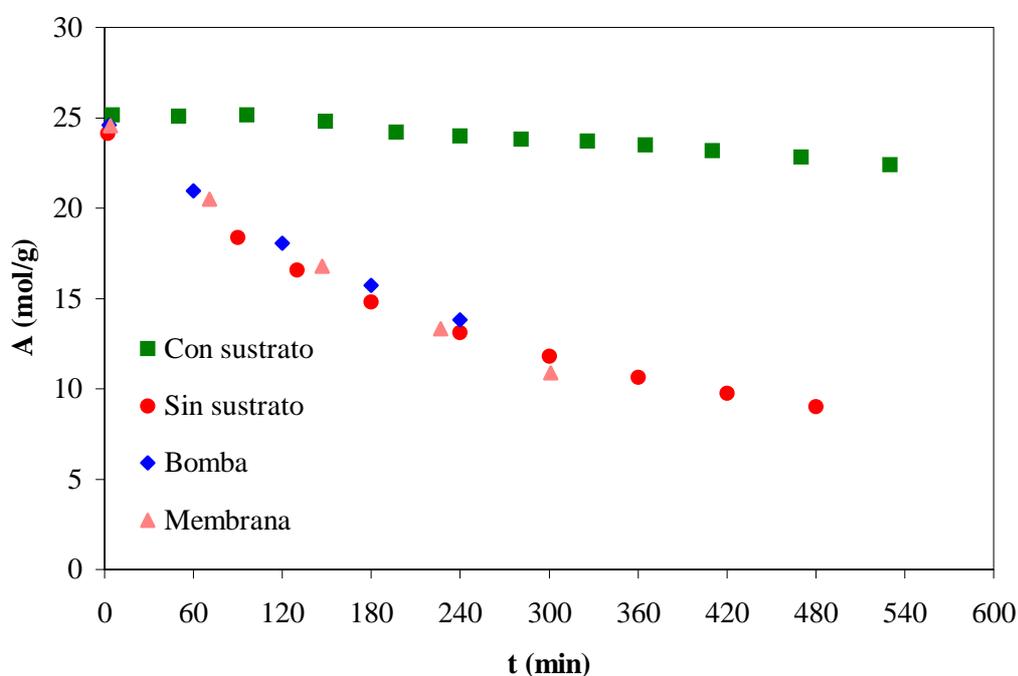


Figura 22. Desactivación de la enzima.

No se detectó actividad enzimática en los filtrados, lo que sugiere una perfecta confinación de la enzima en el reactor de membrana.

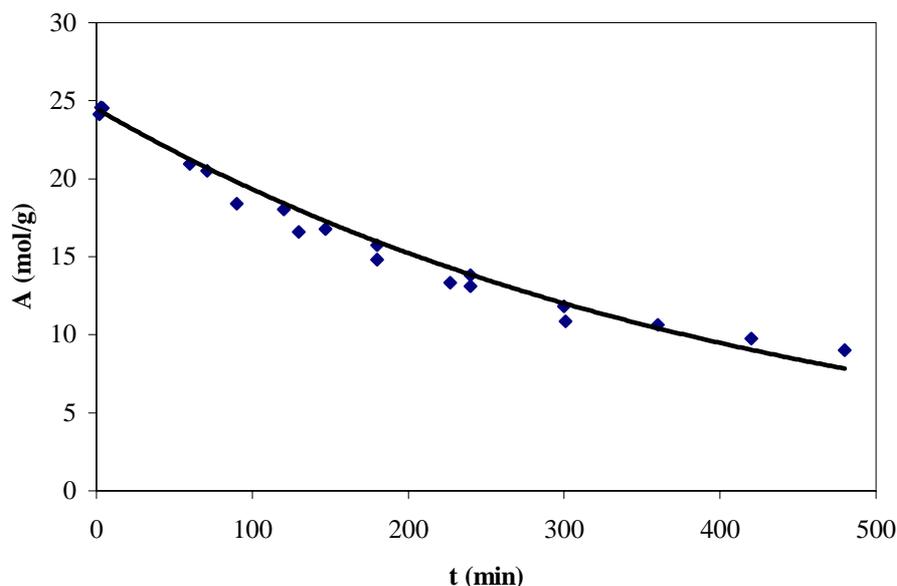


Figura 23. Ajuste de la desactivación de la enzima a una cinética de primer orden.

5.6. Cinética de la hidrólisis.

Los resultados obtenidos en el estudio de la reacción de hidrólisis de proteínas del lactosuero con la enzima bacteriana Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C a distintas concentraciones iniciales de enzima y sustrato, Tabla 26, se resumen en el Apéndice 9.4.

Tabla 26. Experimentos realizados con el sistema WPC-Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C.

s_0 (g/L)	e_0 (g/L)	Tabla
25	0.25	9.14
	0.50	9.11
50	0.05	9.10
	0.50	9.12
	2.50	9.13
100	0.50	9.15

En la Figura 24 se representa el grado de hidrólisis frente al tiempo de reacción para los experimentos realizados con una concentración de proteína de 50 g/L y diferentes concentraciones iniciales de enzima. En la Figura 25 se realiza la misma representación para los experimentos llevados a cabo a distintas concentraciones de sustrato.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los casos se observa que la velocidad de reacción disminuye apreciablemente con el tiempo y que el grado de hidrólisis tiende a un valor límite, muy por debajo de una hidrólisis total de la proteína. Estos hechos pueden ser debidos fundamentalmente a tres causas:

- Disminución de la concentración de enlaces peptídicos susceptibles de ser hidrolizados.
- Inhibición enzimática por productos de la reacción.
- Desnaturalización de la enzima o formación irreversible de complejos en los que intervenga la enzima

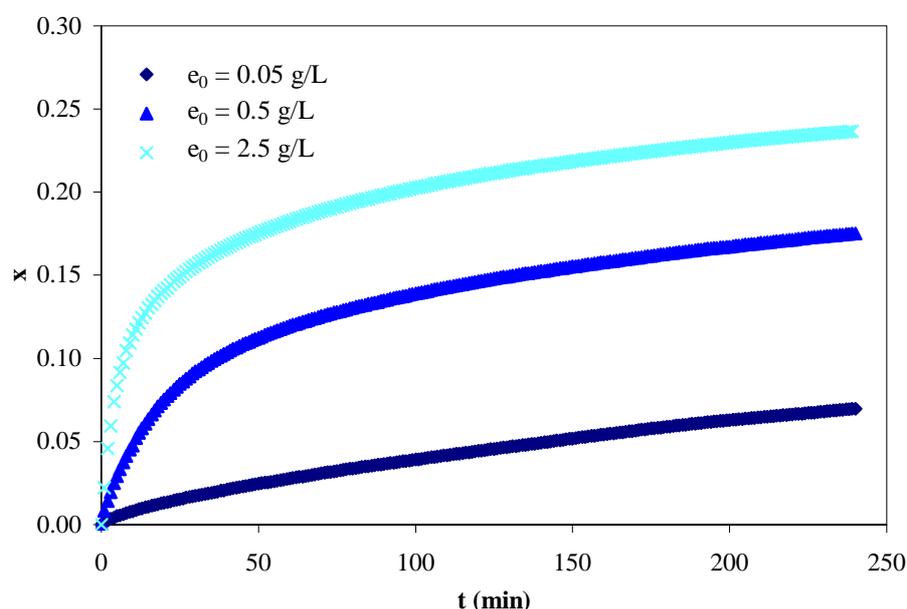


Figura 24. Influencia de la concentración de enzima en el grado de hidrólisis para una concentración de sustrato $s_0 = 50$ g/L, $T = 50$ °C y $pH = 8.5$.

Dado que en la cinética enzimática la velocidad de reacción es generalmente proporcional a la concentración de enzima activa

$$r_h = s_0 h_T \frac{dx}{dt} = f(s_0, x, c_i) e \quad [5.64]$$

donde c_i representa las concentraciones de todas las sustancias presentes que no participan en la reacción pero pueden influir en la velocidad de la misma, separando variables en [5.64] se obtiene

$$s_0 h_T \int_0^x \frac{1}{f(s_0, x, c_i)} dx = \int_0^t e dt \quad [5.65]$$

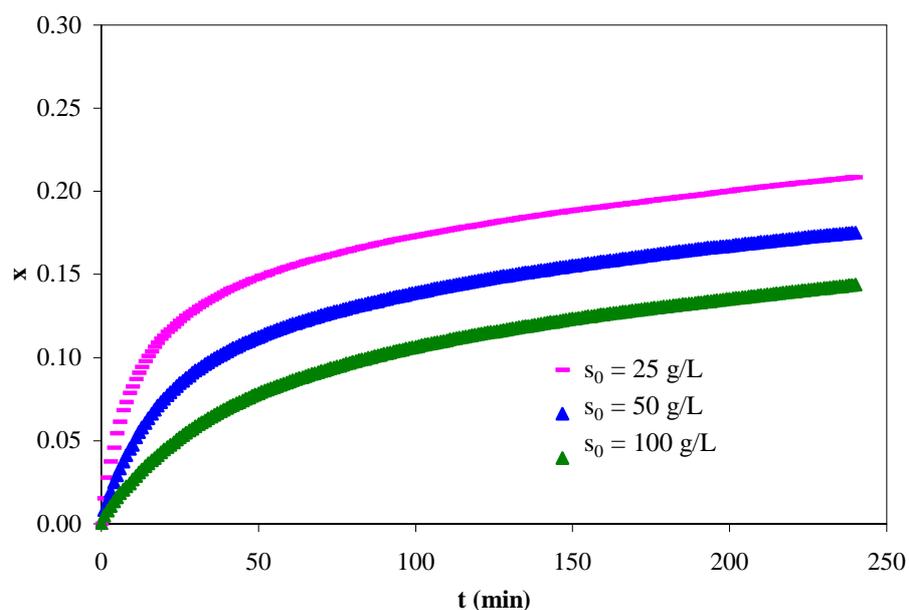


Figura 25 Influencia de la concentración de sustrato en el grado de hidrólisis para una concentración de enzima $e_0 = 0.50$ g/L, $T = 50$ °C y $pH = 8.5$.

que pone de manifiesto que, para unas condiciones iniciales dadas, el grado de hidrólisis alcanzado dependerá del valor de la integral del segundo miembro (Camacho *et al.*, 1988).

Si no se produce desnaturalización enzimática, como se ha comprobado que ocurre en presencia de sustrato, se tendrá

$$\int_0^t e \, dt = e_0 t \quad [5.66]$$

y por tanto cabe esperar que al representar el grado de hidrólisis frente al producto $e_0 t$, los experimentos realizados a la misma concentración de sustrato se unan en una sola línea independientemente de su concentración inicial de enzima, lo que se comprueba en la Figura 26.

En cuanto a la influencia de la concentración inicial de sustrato, los resultados indican que a pH y T constantes el grado de hidrólisis es función de la variable intensiva $e_0 t/s_0$, Figura 27.

Por tanto, en la ecuación cinética de velocidad deben predominar los términos que corresponden a intermedios de la enzima con otro componente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

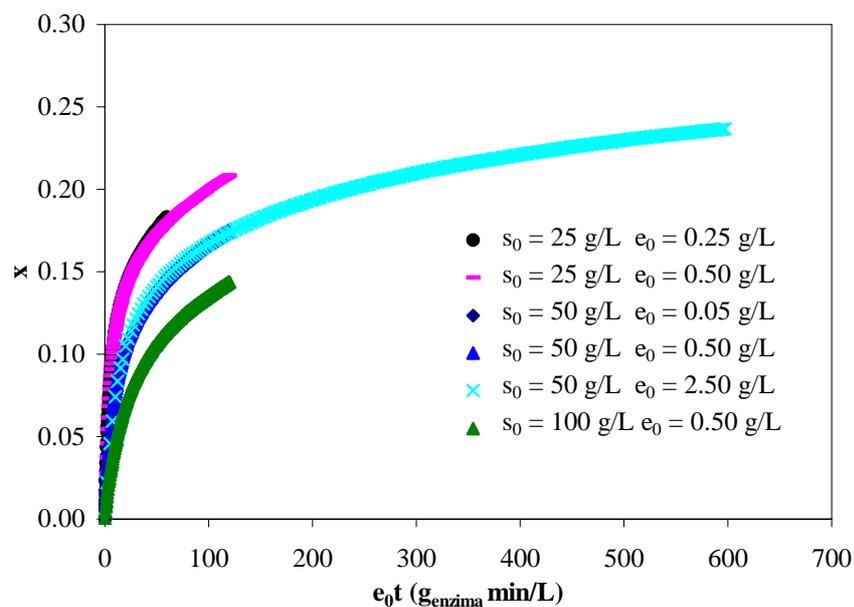


Figura 26. Grado de hidrólisis frente a e₀t.

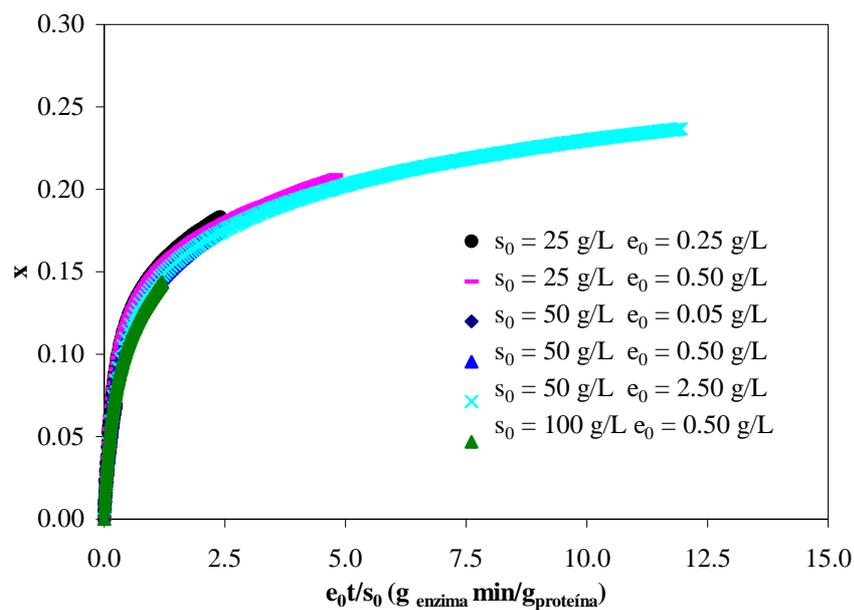


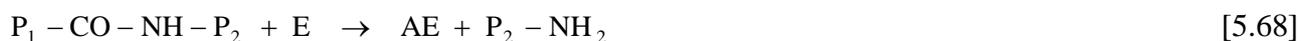
Figura 27. Grado de hidrólisis frente a e₀t/s₀.

En general, en el proceso de hidrólisis la enzima se une a un enlace peptídico provocando su ruptura, por lo que la velocidad de reacción vendrá dada por

$$r_h = s_0 h_T \frac{dx}{dt} = k_h [\text{enlaces}] [\text{enzima}] \quad [5.67]$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si se asume la formación del complejo intermedio acilenzima, un posible mecanismo para el proceso de rotura de enlaces será:



Aplicando la aproximación de estado estacionario para el intermedio, admitiendo una gran afinidad de la enzima por el sustrato de forma que no haya enzima libre y que ésta se una por igual a un enlace peptídico o a un grupo carboxilo terminal, la concentración de enzima podrá evaluarse como

$$[\text{enzima}] = \frac{e_0}{K_1 s_0 h_T} \quad [5.70]$$

Por otro lado, para evaluar la concentración de enlaces susceptibles de ser hidrolizados habrá que tener en cuenta que la enzima presenta cierta selectividad por un determinado tipo de enlaces, aquéllos que romperá. Además no todos tendrán la misma reactividad y, debido a la estructura globular de la proteína, tampoco tendrán, al menos al principio, la misma accesibilidad. Por lo que

$$[\text{enlaces}] = \text{factor de accesibilidad} \cdot \text{factor de reactividad} \cdot s_0 h_T (x_{\max} - x) \quad [5.71]$$

En el caso de la enzima bacteriana utilizada en esta investigación, la subtilisina Protex 6L rompe principalmente enlaces en los que participen aminoácidos con cadenas no cargadas, tales como prolina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina y alanina. Teniendo en cuenta la composición en aminoácidos de la proteína nativa, es posible calcular el grado de hidrólisis máximo alcanzable evaluando la fracción de enlaces susceptibles de rotura.

Por ejemplo, en el caso de fenilalanina, el porcentaje en peso en la proteína es 4.3 % y su peso molecular es 165.2 g/mol. Considerando el número de enlaces en la proteína, $h_T = 0.0088$ mol/g, la fracción de enlaces en la que participa la fenilalanina será:

$$\% \text{ Enlaces fenilalanina} = \frac{4.3}{165.2 \cdot 0.0088} = 2.9 \%$$

Analogamente, se calcula el porcentaje para los demás aminoácidos, Tabla 27.

El grado de hidrólisis límite será la suma de las fracciones correspondientes a cada aminoácido, resultando $x_{\max} = 0.35$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 27. Enlaces susceptibles de ser hidrolizados por Protex 6L en proteínas del lactosuero.

Aminoácido	% en proteína	PM (g/mol)	% Enlaces
Pro	5.8	115.1	5.72
Val	8.5	117.1	8.24
Ile	5.4	131.2	4.67
Leu	8.6	131.2	7.44
Phe	4.3	165.2	2.95
Ala	5.4	89.1	6.88

Para evaluar la fracción de enlaces peptídicos expuestos se asume que la proteína globular es una esfera de diámetro d_p que contiene n_x enlaces peptídicos, por tanto el volumen asignable a un enlace es

$$V_{\text{enlace}} = \frac{\pi d_p^3}{6 n_x} = \frac{\pi d_e^3}{6} \Rightarrow d_e = \frac{d_p}{\sqrt[3]{n_x}} \quad [5.72]$$

Cuando el radio de la proteína sea igual al diámetro asignable a un enlace, todos los enlaces peptídicos estarán expuestos. De esta forma, la fracción de enlaces no expuestos se evaluará como

$$\text{Fracción enlaces no expuesta} = \frac{\frac{\pi (d_p - d_e)^3}{6}}{\frac{\pi d_p^3}{6}} = \left(\frac{d_p - d_e}{d_p} \right)^3 = \left(1 - \frac{1}{\sqrt[3]{n_x}} \right)^3 \quad [5.73]$$

Por lo que la fracción de enlaces expuestos o factor de accesibilidad será

$$\text{Factor accesibilidad} = 1 - \left(1 - \frac{1}{\sqrt[3]{n_x}} \right)^3 = \frac{3}{n_x^{1/3}} + \frac{1}{n_x} - \frac{3}{n_x^{2/3}} \quad [5.74]$$

El valor de n_x , enlaces peptídicos por péptido en cualquier instante es

$$n_x = \frac{\frac{s_0}{PM} n_0 (1-x)}{\frac{s_0}{PM} (1+n_0 x)} = \frac{n_0 (1-x)}{1+n_0 x} \quad [5.75]$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

donde n_0 , enlaces por péptido en la proteína nativa, es 148 para las proteínas del lactosuero empleadas, como se ha calculado anteriormente.

La variación del factor de accesibilidad con el grado de hidrólisis se muestra en la Tabla 28.

Tabla 28. Grado de hidrólisis y factor de accesibilidad.

x	Factor de accesibilidad
0.01	0.589
0.05	0.774
0.10	0.868
0.15	0.920
0.20	0.952
0.25	0.973
0.30	0.986
0.35	0.994
0.40	0.998
0.45	1.000
0.50	1.000

Como puede observarse, al 20 % de hidrólisis, el 95 % de los enlaces estarían expuestos. Al 35 % de hidrólisis prácticamente la totalidad de los enlaces serían accesibles para la enzima.

Con todo esto, la velocidad de hidrólisis quedaría

$$r_h = s_0 h_T \frac{dx}{dt} = k_h f_{\text{reactividad}} \left(\frac{3}{n_x^{1/3}} + \frac{1}{n_x} - \frac{3}{n_x^{2/3}} \right) s_0 h_T (0.35 - x) \frac{e_0}{K_1 s_0 h_T} \quad [5.76]$$

y por tanto

$$\frac{dx}{d\left(\frac{e_0 t}{s_0}\right)} = k f_{\text{reactividad}} \left(\frac{3}{n_x^{1/3}} + \frac{1}{n_x} - \frac{3}{n_x^{2/3}} \right) (0.35 - x) \quad [5.77]$$

con la constante k igual a

$$k = \frac{k_h}{K_1 h_T} \quad [5.78]$$

Para el cálculo del factor de reactividad se han calculado las $dx/d(e_0t/s_0)$ mediante el ajuste de los resultados experimentales a funciones splines cúbicas (Klaus y van Ness, 1967), seleccionando los nodos y el número de éstos de forma que se minimice el sumatorio de los cuadrados residuales

$$SSR = \frac{\sum (x_{cal} - x_{exp})^2}{M - N} \quad [5.79]$$

donde M es el número de parejas de datos y N es número de nodos (Tao y Watson, 1988). El algoritmo empleado es el indicado por Guadix (1993).

En el Apéndice 9.5 se muestran los valores obtenidos que se han representado en la Figura 28.

A partir de estos datos y con la ecuación [5.77] se ha evaluado k-factor de reactividad, Figura 29, que puede ajustarse a la función exponencial:

$$k \cdot f_{reactividad} = 3.585 \exp(-20.04 x), r^2 = 0.985 \quad [5.80]$$

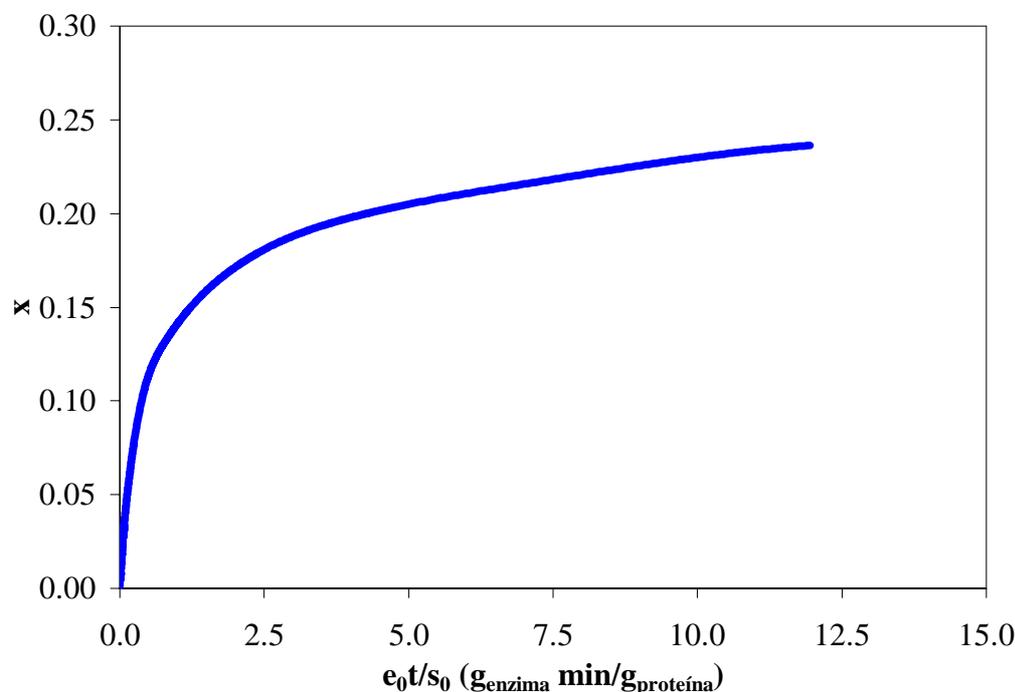


Figura 28 Ajuste mediante funciones spline cúbicas del grado de hidrólisis frente a la variable intensiva e_0t/s_0 .

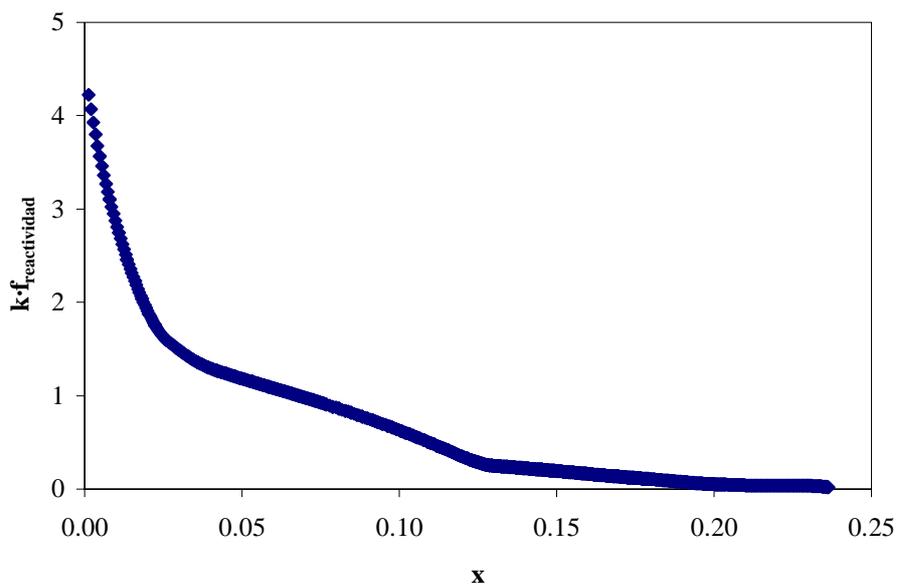


Figura 29. Valores de k-factor de reactividad calculados en función del grado de hidrólisis.

Finalmente, con los valores calculados se pueden simular (programa recogido en el Apéndice 9.6) los experimentos realizados, Figura 30.

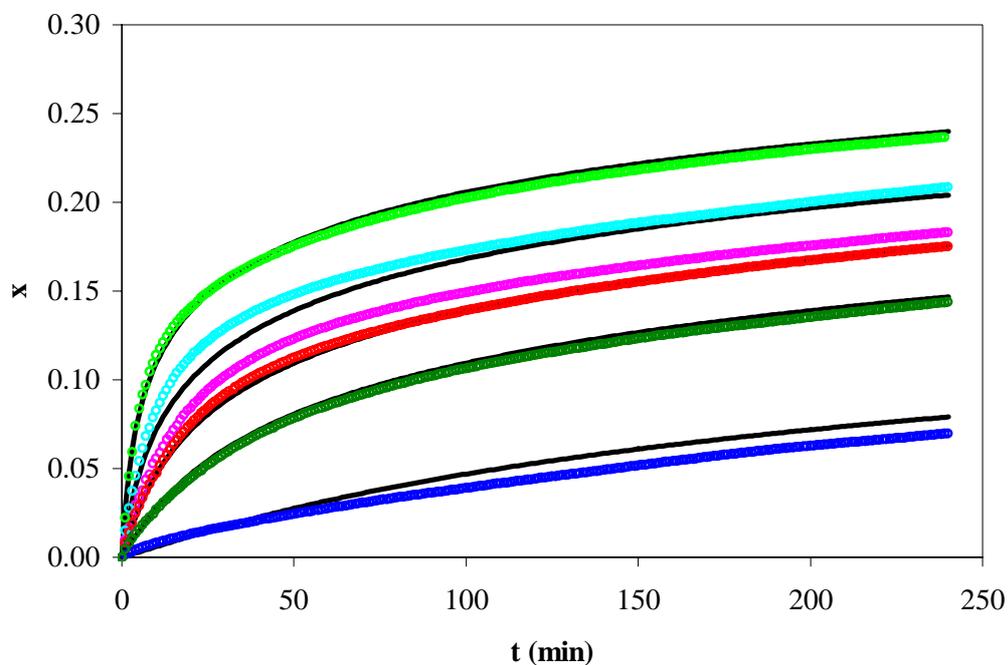


Figura 30. Valores experimentales y simulados (en negro) con ec [5.80] de grado de hidrólisis frente al tiempo. \circ $s_0 = 25$ g/L, $e_0 = 0.25$ g/L; \circ $s_0 = 25$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L; \circ $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.05$ g/L; \circ $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L; \circ $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 2.50$ g/L; \circ $s_0 = 100$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observa una desviación a bajos grados de hidrólisis, con errores en los valores simulados respecto a los experimentales que llegan a ser del 16 %, en tanto que el modelo se ajusta aceptablemente a altos grados de hidrólisis.

Para solventar estas discrepancias, es conveniente realizar un ajuste de $k \cdot f_{\text{reactividad}}$ considerando las diferentes zonas observadas en la Figura 29. De esta forma, el ajuste más adecuado es exponencial para grados de hidrólisis hasta el 2.5 %, lineal entre el 2.5 % y el 13 % y de nuevo exponencial a partir del 13 %:

$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 4.274 \exp(-39.92 x), r^2 = 0.997, x < 0.025 \quad [5.81]$$

$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 1.841 - 12.087 x, r^2 = 0.996, 0.025 < x < 0.13 \quad [5.82]$$

$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 3.585 \exp(-20.04 x), r^2 = 0.985, x > 0.13 \quad [5.83]$$

Los valores simulados a partir de las ecuaciones [5.81] a [5.83] se representan en la Figura 31. En este caso la desviación es inferior al 7 %

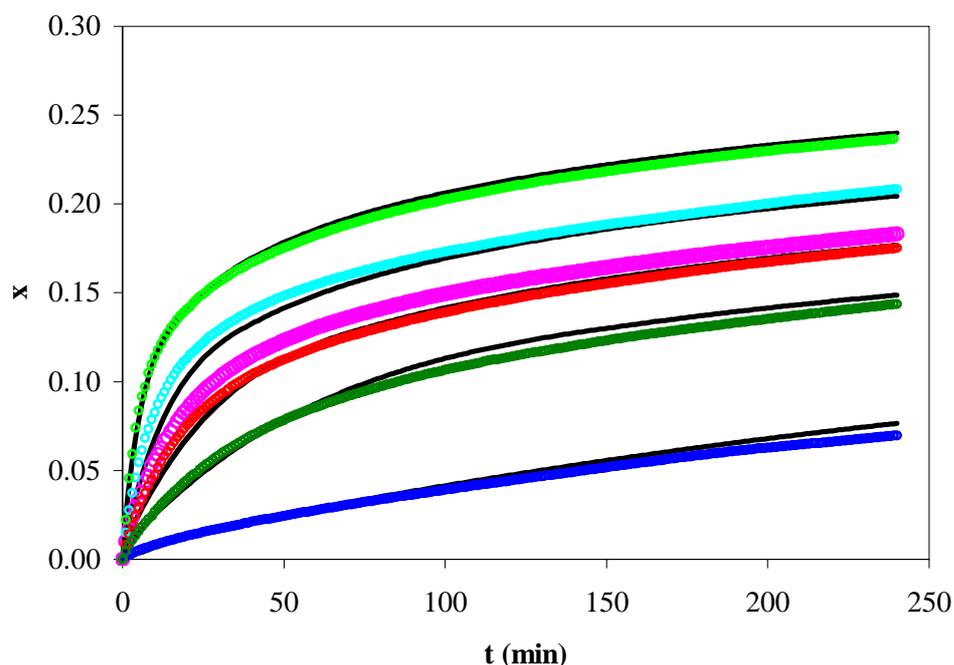


Figura 31. Valores experimentales y simulados (en negro) con las ec [5.81], [5.82] y [5.83] de grado de hidrólisis frente al tiempo. \bullet $s_0 = 25$ g/L, $e_0 = 0.25$ g/L; \bullet $s_0 = 25$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L; \bullet $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.05$ g/L; \bullet $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L; \bullet $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 2.50$ g/L; \bullet $s_0 = 100$ g/L, $e_0 = 0.50$ g/L.

La existencia de diferentes zonas en la Figura 29 puede estar relacionada con la distinta reactividad de los enlaces peptídicos, dependiendo de los aminoácidos que intervienen. Así, la zona de mayor reactividad, que comprende hasta grados de hidrólisis del 2.5 %, sería debida a enlaces en los que

interviene el aminoácido fenilalanina, aromático y más hidrofóbico, que participa en el 2.9 % de los enlaces en la proteína nativa (Tabla 27). A continuación, la región entre el 2.5 % y el 13 % correspondería al ataque a los aminoácidos leucina e isoleucina, ambos con largas cadenas alifáticas que engloban el 12.1 % de los enlaces totales. Finalmente, los aminoácidos prolina, valina y alanina, con cadenas alifáticas cortas, formarían parte de los enlaces menos reactivos, dentro de los susceptibles de ser hidrolizados, con un 20.8 % de los enlaces totales, hasta completar el 35 % antes calculado.

Una vez calculado y justificado el factor de reactividad, es posible expresar la ecuación cinética que rige la hidrólisis enzimática de proteínas del lactosuero con la enzima bacteriana Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C de la forma

$$\frac{dx}{dt} = k f_{\text{reactividad}} (0.35 - x) f_{\text{accesibilidad}} \frac{e_0}{s_0} \quad [5.84]$$

donde el factor de reactividad viene dado por las ecuaciones [5.81] a [5.83] y el factor de accesibilidad por las ecuaciones [5.74] y [5.75].

5.7. Reactor discontinuo.

La determinación de la ecuación cinética permite simular la reacción de hidrólisis en un reactor discontinuo mezcla perfecta. El grado de hidrólisis alcanzado en cualquier instante, t, vendrá dado por la integral

$$x = \int_0^t k f_{\text{reactividad}} (0.35 - x) f_{\text{accesibilidad}} \frac{e_0}{s_0} dt \quad [5.85]$$

La extensión de la reacción también puede ser seguida mediante la conversión a nitrógeno soluble, definida como:

$$\text{Conversión} = \frac{SN - SN_0}{TN - SN_0} \quad [5.86]$$

donde SN = nitrógeno soluble en cualquier instante,

SN₀ = nitrógeno soluble en la proteína nativa

TN = nitrógeno total.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El valor de la conversión depende únicamente del grado de hidrólisis de la proteína y no de la relación E/S empleada. Esta correspondencia, calculada de forma análoga a la utilizada en el apartado 5.4.1, se indica en la Tabla 29.

Tabla 29. Conversión a nitrógeno soluble y grado de hidrólisis en un reactor discontinuo para el sistema WPC-Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C

x	Conversión
0.0000	0.0000
0.0257	0.1870
0.0514	0.2824
0.0772	0.3817
0.1029	0.5000
0.1286	0.6030
0.1540	0.6450
0.1801	0.7557
0.2058	0.8129
0.2146	0.8206

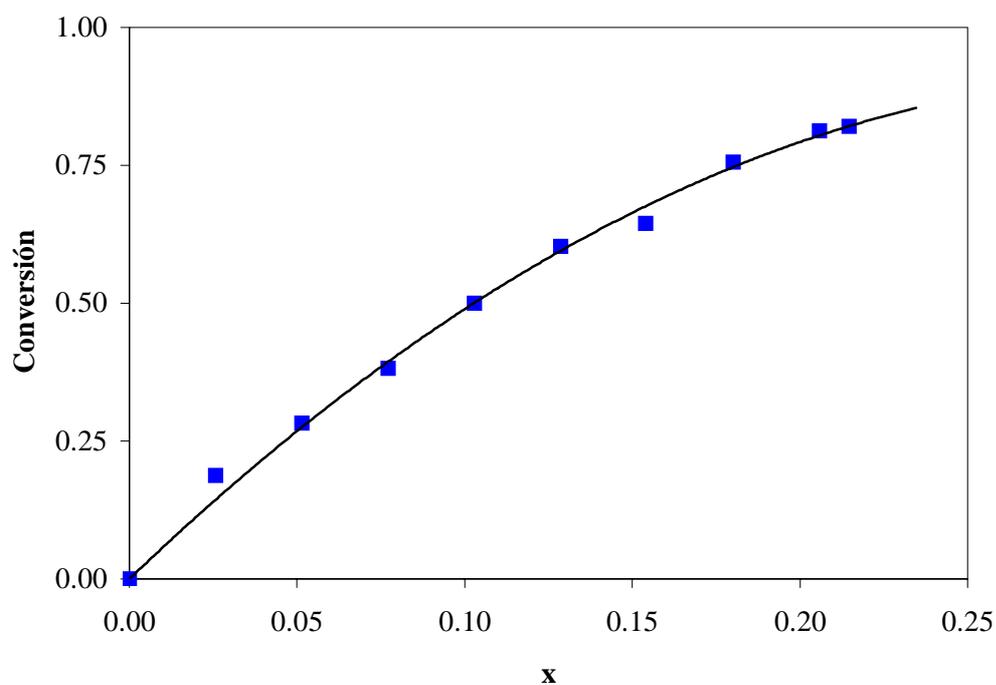


Figura 32. Grado de hidrólisis y conversión a nitrógeno soluble

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 32 se observa que la conversión frente al grado de hidrólisis se ajusta a una parábola de forma que

$$\text{Conversión} = 5.825x - 9.3177x^2, \quad r^2 = 0.995 \quad [5.87]$$

Otro parámetro importante, que es una medida de la eficacia de la operación en el reactor, es la capacidad del mismo. Se define como la masa de nitrógeno soluble producida por masa de enzima y por unidad de tiempo. Considerando la fracción de nitrógeno soluble en la proteína nativa, 5.72 %, y que, para proteínas del lactosuero, 6.38 equivalentes de proteína corresponden a 1 equivalente de nitrógeno, la capacidad puede calcularse por

$$\text{Capacidad} = \frac{\frac{s_0}{6.38} (1 - 0.572) \text{ Conversión}}{e_0 t} \quad [5.88]$$

La simulación del reactor discontinuo se ha realizado mediante un programa en ISIM, listado en el Apéndice 9.6. Se calculan los valores de grado de hidrólisis, conversión y capacidad para tiempos desde 0 a 360 minutos. El rango de relaciones E/S empleadas varía entre el 0.5 % y el 10 %. Los intervalos de tiempo y relación E/S han sido seleccionados al ser los comúnmente utilizados en la práctica.

Algunos de los valores simulados se recogen en el Apéndice 9.7. Las curvas de nivel (Figura 33, Figura 34 y Figura 35) ofrecen una visión clara del comportamiento del reactor discontinuo. Se aprecia que para grados de hidrólisis bajos, pequeños aumentos en el tiempo o la relación E/S provocan grandes incrementos del grado de hidrólisis debido a que la mayoría de los enlaces peptídicos por los que la enzima tiene mayor preferencia están sin hidrolizar. Sin embargo, a grados de hidrólisis altos, por encima del 25 %, la mayoría de estos enlaces ya han sido rotos y el aumentar tiempo o relación E/S no produce un cambio apreciable en el grado de hidrólisis alcanzado.

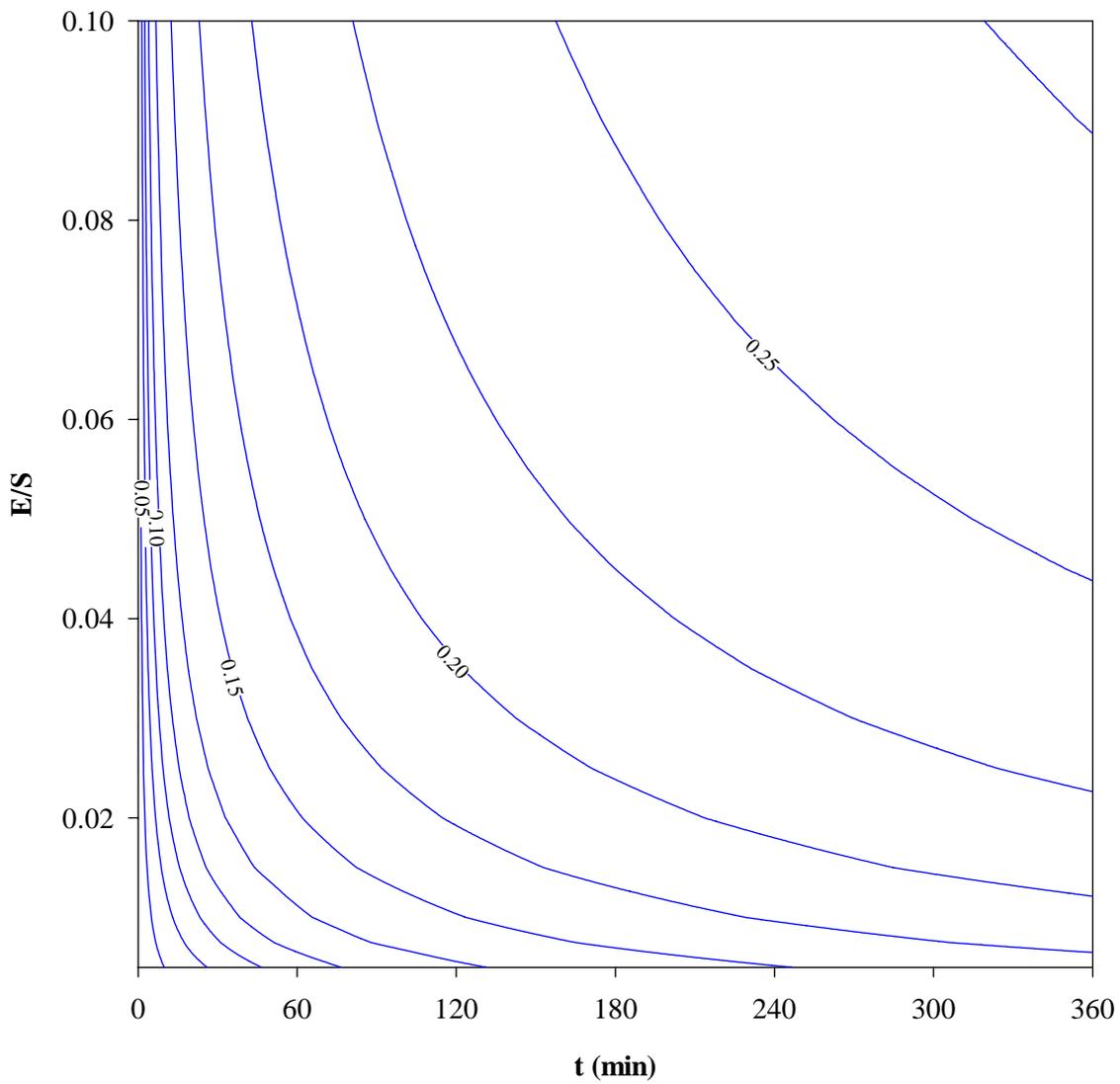


Figura 33. Curvas de nivel del grado de hidrólisis en función del tiempo y la relación E/S en el reactor discontinuo.

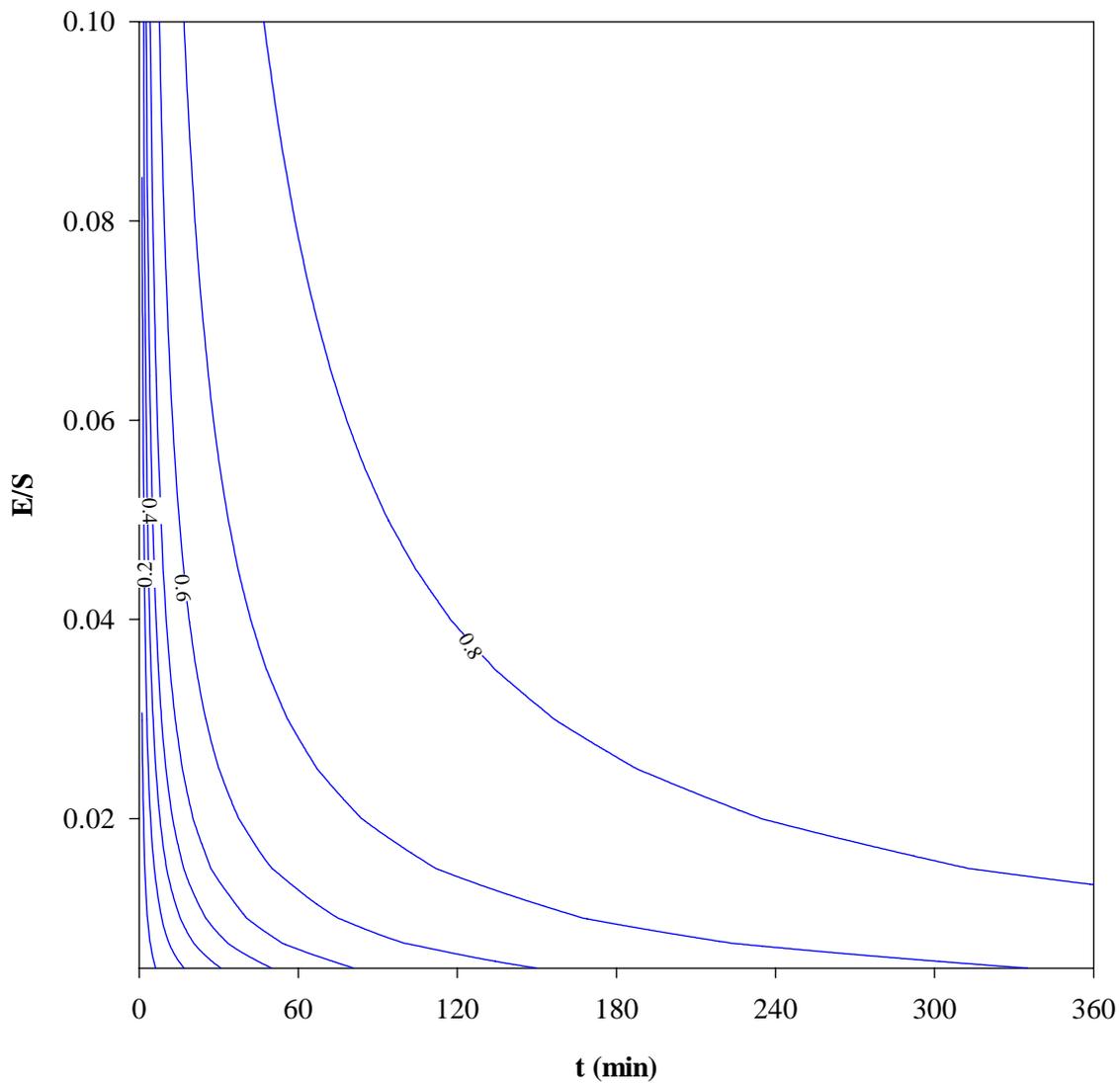


Figura 34. Curvas de nivel de la conversión en función del tiempo y la relación E/S en el reactor discontinuo.

De forma análoga, puesto que la conversión a nitrógeno soluble viene determinada por el grado de hidrólisis, su variación con el tiempo y la relación E/S será similar, variando bruscamente para valores bajos y manteniéndose prácticamente constante a valores altos.

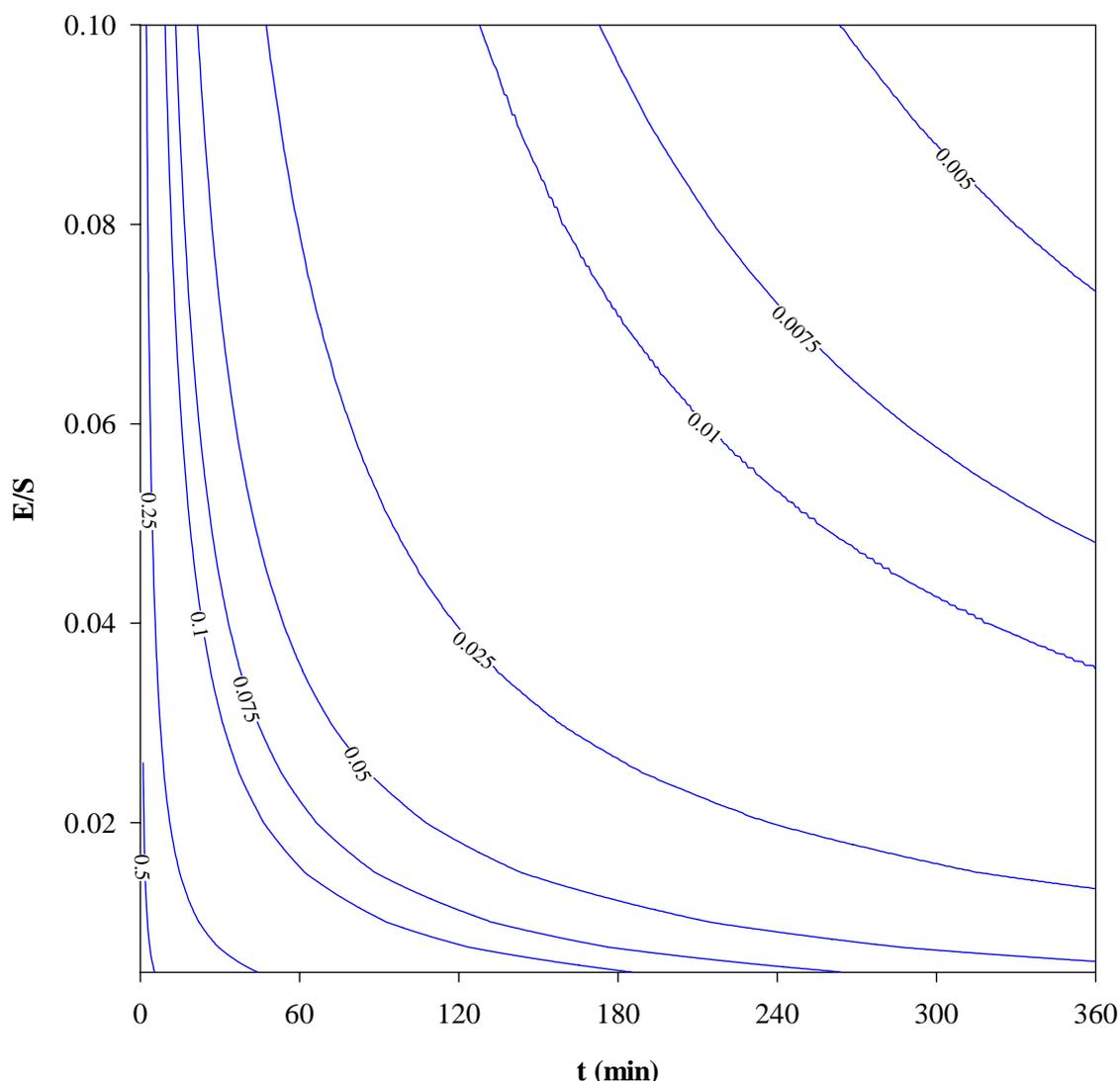


Figura 35. Curvas de nivel de la capacidad en función del tiempo y la relación E/S en el reactor discontinuo.

Respecto a la capacidad del reactor se observa que las capacidades altas se consiguen a t y E/S bajos, mientras que a valores altos la capacidad es muy baja al ser constante la conversión a nitrógeno soluble. Sin embargo, un funcionamiento del reactor a alta capacidad implicaría trabajar en unos grados de hidrólisis no superiores al 10 %, que no siempre serán suficientes para obtener un producto con las propiedades deseadas.

5.8. Caracterización del módulo de membrana.

La caracterización del módulo de membrana plana de polietersulfona de corte 3 kDa consiste en la obtención de la relación existente entre los caudales de retenido y filtrado que pueden ser suministrados y las presiones de alimentación, retenido y filtrado aplicadas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para caracterizar el caudal de retenido, se emplea en primer lugar agua desionizada en recirculación total y con la válvula de filtrado cerrada. La temperatura de trabajo es 50 °C, al igual que la óptima de la enzima seleccionada, ya que será la de funcionamiento del reactor de membrana. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 30.

Tabla 30 Caudal de retenido y presiones con agua desionizada a 50 °C

P_e (psi)	P_s (psi)	ΔP (psi)	Q_r (L/h)
5	0	5	40
10	0	10	60
15	0	15	76
20	0	20	94

Puesto que en el reactor el producto será un hidrolizado de proteínas séricas, será preciso determinar, además de con agua, el caudal con hidrolizado. Para ello se prepara un hidrolizado con una concentración $s_0 = 50$ g/L, $pH = 8.5$, $T = 50$ °C y $x = 0.10$ y se miden los caudales de retenido en función de las presiones, Tabla 31.

Tabla 31 Caudal de retenido y presiones para un hidrolizado de WPC al 10 % y 50 °C.

P_e (psi)	P_s (psi)	ΔP (psi)	Q_r (L/h)
3	0	3	32
5	0	5	40
7	0	7	50
10	0	10	61
12	0	12	68
15	0	15	80
17	0	17	86
20	0	20	97
19	10	9	60
30	23	7	48
36	28	8	56
24	7	17	93

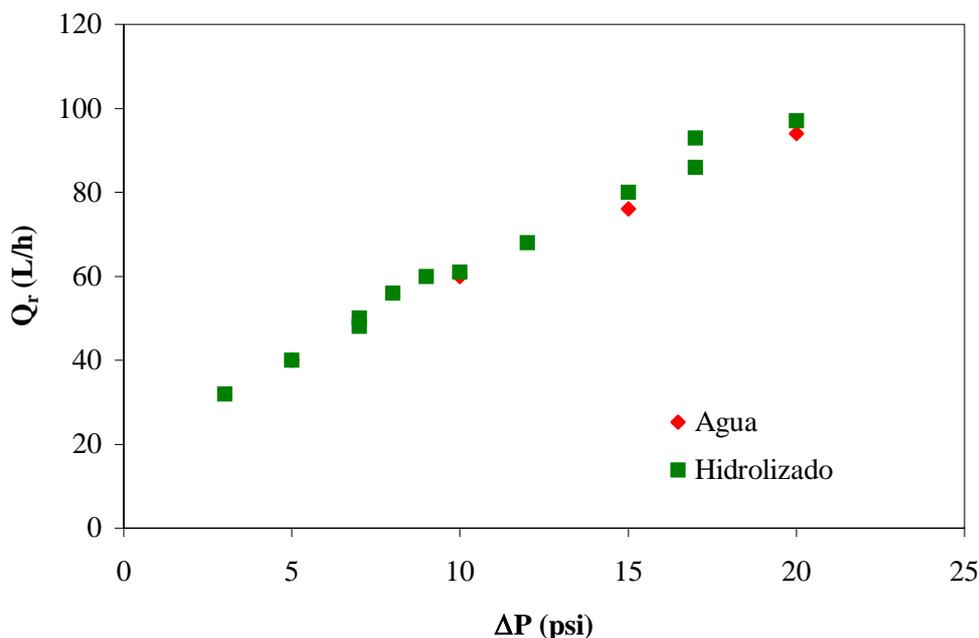


Figura 36. Caudales de retenido frente a caída de presión para agua e hidrolizado

Si se representan conjuntamente los datos de la Tabla 30 y Tabla 31, indicando en abcisas la caída de presión en la membrana y en ordenadas y el caudal de retenido, se observa que se unen en una sola curva, Figura 36, lo que pone de manifiesto que no existe una diferencia de comportamiento apreciable entre agua y producto, en cuanto a la circulación de los mismos por la cámara de retenido.

El hecho de que no se trate de una recta que pase por el origen, indica que el flujo es turbulento y la relación vendrá dada por la expresión

$$\Delta P = \Phi_T Q_r^{2-n} \quad [5.89]$$

según lo descrito por Cheryan (1986) donde Φ_T es una constante para el módulo de membrana y n varía entre 0.15 y 0.50.

Para calcular estos parámetros se realiza una regresión lineal de $\log \Delta P$ frente a $\log Q_r$, Figura 37 5.35.

$$\log \Delta P = \log \Phi_T + (2 - n) \log Q_r \quad [5.90]$$

$$\Phi_T = 10^{-1.9322} = 0.0117$$

$$n = 2 - 1.6341 = 0.3659$$

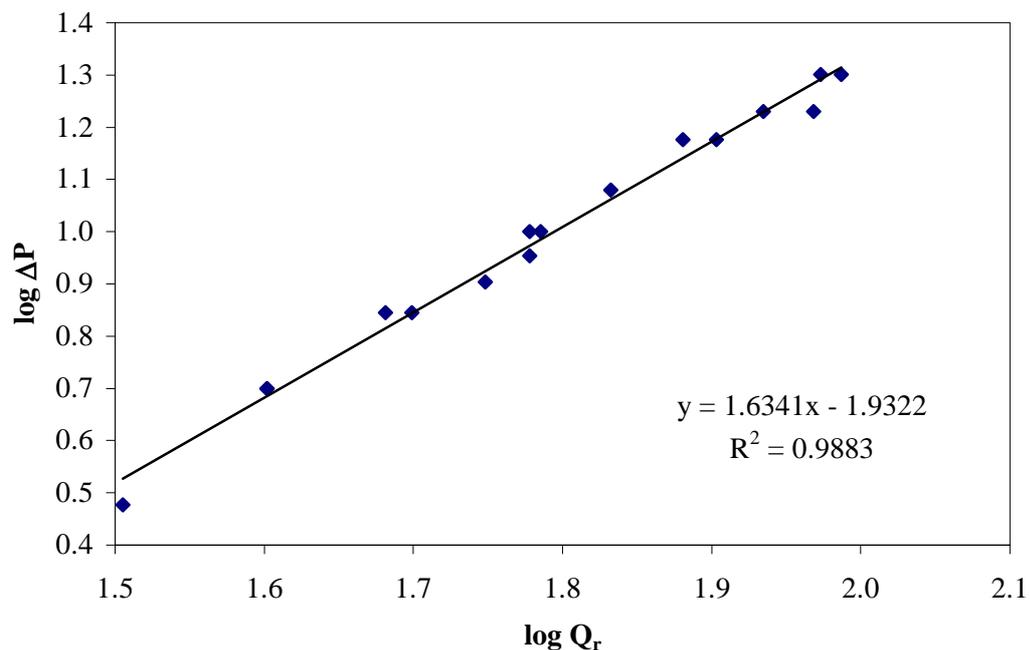


Figura 37. Relación entre caída de presión y caudal de retenido para agua e hidrolizado.

Una vez determinado el caudal de retenido para agua e hidrolizado es necesario calibrar el flujo de filtrado a través de la membrana. En la Tabla 32 aparecen los valores de caudal de filtrado para agua desionizada a 50 °C.

Para modelizar el caudal de filtrado se emplea el concepto de resistencias en serie (Cheryan, 1986). De esta forma el caudal vendrá dado por la expresión:

$$Q_f = \frac{P_T}{R_m} \quad [5.91]$$

donde P_T = presión transmembrana

R_m = resistencia intrínseca de la membrana para agua pura

En la Figura 38 se observa como los datos de la Tabla 32 se ajustan a una recta que pasa por el origen, confirmando la ecuación [5.91]

De manera que R_m será la inversa de la pendiente de la recta:

$$R_m = 0.6858 \text{ psi min / mL}, r^2 = 0.9872$$

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 32. Caudales de filtrado y presiones para agua desionizada

P_c (psi)	P_s (psi)	ΔP (psi)	P_T (psi)	Q_f (mL/min)
5	0	5	2.5	4
11	6	5	8.5	15
16	11	5	13.5	22
20	15	5	17.5	28
25	20	5	22.5	34
30	25	5	27.5	40
10	0	10	5	7.5
20	10	10	15	23.5
30	20	10	25	37
39	29	10	34	48
15	0	15	7.5	10.5
21	6	15	13.5	19
30	15	15	22.5	32
40	25	15	32.5	45

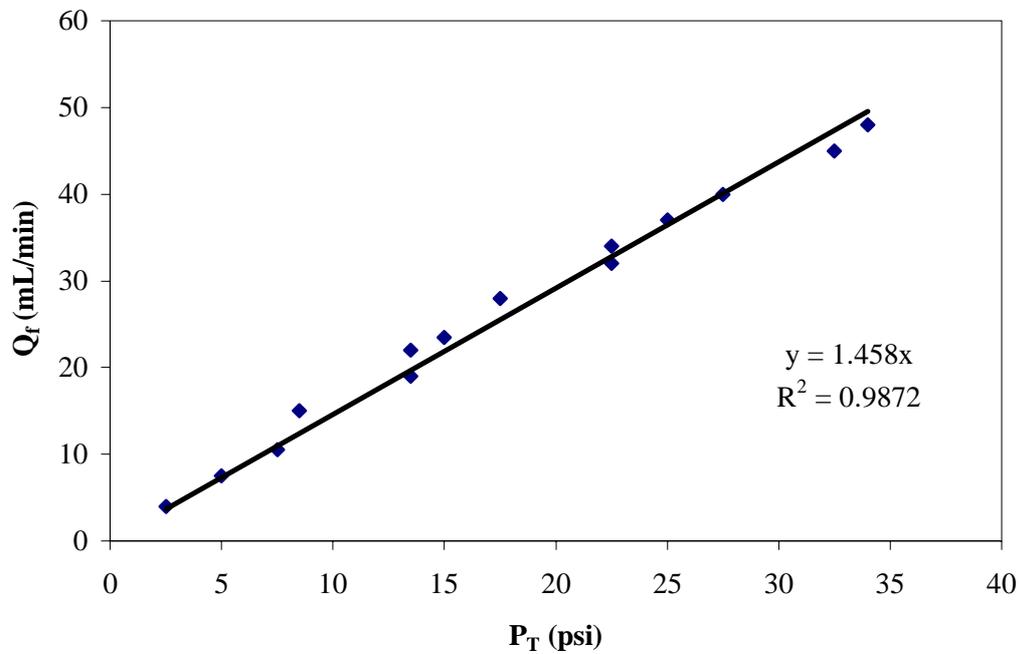


Figura 38, Relación entre presión transmembrana y caudal de filtrado para agua.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para un hidrolizado a una concentración en proteína $s_0 = 50$ g/L, pH = 8.5, T = 50 °C y $x = 0.10$, los caudales de filtrado son los recogidos en la Tabla 33.

Tabla 33. Caudales de filtrado y presiones para hidrolizado.

P_e (psi)	P_s (psi)	ΔP (psi)	P_T (psi)	Q_f (mL/min)
10	0	10	5	2
20	10	10	15	6
30	20	10	25	10.5
40	30	10	35	14.5
50	40	10	45	19
15	0	15	7.5	2.5
25	10	15	17.5	7
35	20	15	27.5	11
40	30	15	35	16
50	35	15	42.5	17
20	0	20	10	3
30	10	20	20	7.5
40	20	20	30	11.5
45	25	20	35	14
50	30	20	40	20.5

Si tiene lugar colmatación de la membrana debida a interacciones específicas membrana-soluto, por deposición sobre la superficie o por taponamiento de los poros, la resistencia intrínseca de la membrana cambiará. Puesto que este tipo de colmatación es debido generalmente a interacciones fisicoquímicas, no vendrá afectada por los parámetros de operación. La resistencia asociada se denomina resistencia de fouling, R_f .

Finalmente es necesario tener en cuenta la resistencia provocada por la capa de polarización por concentración en la superficie de la membrana, R_p , que puede considerarse proporcional a la presión transmembrana aplicada.

Por lo tanto, la ecuación general queda

$$Q_f = \frac{P_T}{R_m + R_f + R_p} = \frac{P_T}{R_m + R_f + f(P_T)} \quad [5.92]$$

Esta ecuación explica la existencia de una zona controlada por la presión, a bajas presiones, bajas concentraciones de alimentación y a altas velocidad de recirculación en la que los efectos de polarización son mínimos y de una zona controlada por la transferencia de materia a presiones y concentraciones altas y bajas velocidades donde el flujo se hace independiente de la presión debido a la consolidación de la capa de polarización.

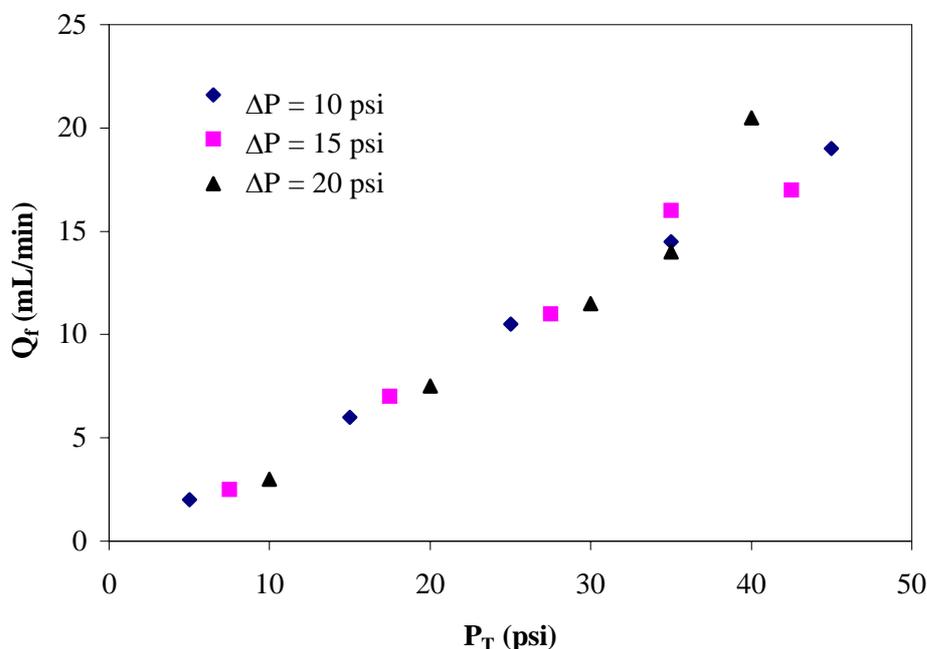


Figura 39. Caudales de filtrado frente a presión transmembrana para hidrolizado.

Si representamos los datos de la Tabla 33, Figura 39, se observa que se ajustan a una línea recta, lo que indica que, en las condiciones de trabajo, no se forma capa de polarización debido a las altas velocidades de recirculación utilizadas.

La inversa de la pendiente en la Figura 40 será R_m+R_f , así que, teniendo en cuenta el valor de R_m calculado anteriormente:

$$R_f = 1.67875 \text{ psi min / mL}, r^2 = 0.9587$$

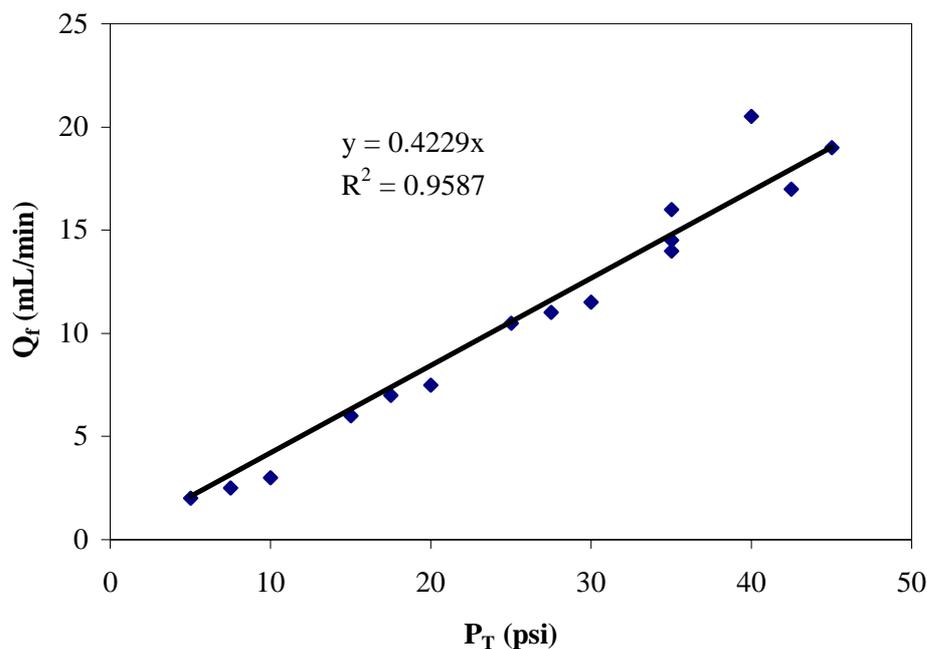


Figura 40. Relación entre presión transmembrana y caudal de filtrado para hidrolizado.

A presiones transmembrana altas se obtienen caudales de filtrado máximos, pero aumenta la velocidad de colmatación de la membrana. A presiones bajas se reduce la colmatación, pero no se consiguen caudales de filtrado aceptables.

Mediante un análisis hidrodinámico de la ultrafiltración del hidrolizado, similar al realizado por Jeantet *et al.* (2000) se observa que en las condiciones de trabajo ensayadas la resistencia de colmatación normalizada, R_f/R_m , permanece independiente del cociente $Q_f/\Delta P$, que equivale a la relación entre flujo a través de la membrana y esfuerzo cortante sobre la superficie de la misma, Figura 41.

Jeantet *et al.* (2000) comprobaron que a valores bajos de esta relación se controla la colmatación de la membrana, pero aumentan los costes por bombeo para mantener la velocidad de recirculación. En cambio, a partir de un valor crítico de $Q_f/\Delta P$ la colmatación se dispara y los costes por limpieza y reemplazo de membranas son inadmisibles.

Puesto que, en nuestro caso R_f/R_m es constante se comprueba que se trabaja por debajo del valor crítico y, por tanto, en condiciones de operación óptimas. Finalmente es necesario determinar si el comportamiento de la membrana es uniforme con el tiempo. Para ello se prepara un hidrolizado con una concentración inicial de proteína, $s_0 = 50$ g/L a $\text{pH} = 8.5$ y $T = 50$ °C, con un grado de hidrólisis, $x = 0.10$. Este hidrolizado se ultrafiltra en el módulo de membrana a 50 °C a una presión

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

transmembrana, $P_T = 25$ psi y retenido y filtrado se recirculan al tanque de alimentación. Se toman muestras del filtrado a distintos tiempos y se analiza su contenido en nitrógeno y su distribución de pesos moleculares.

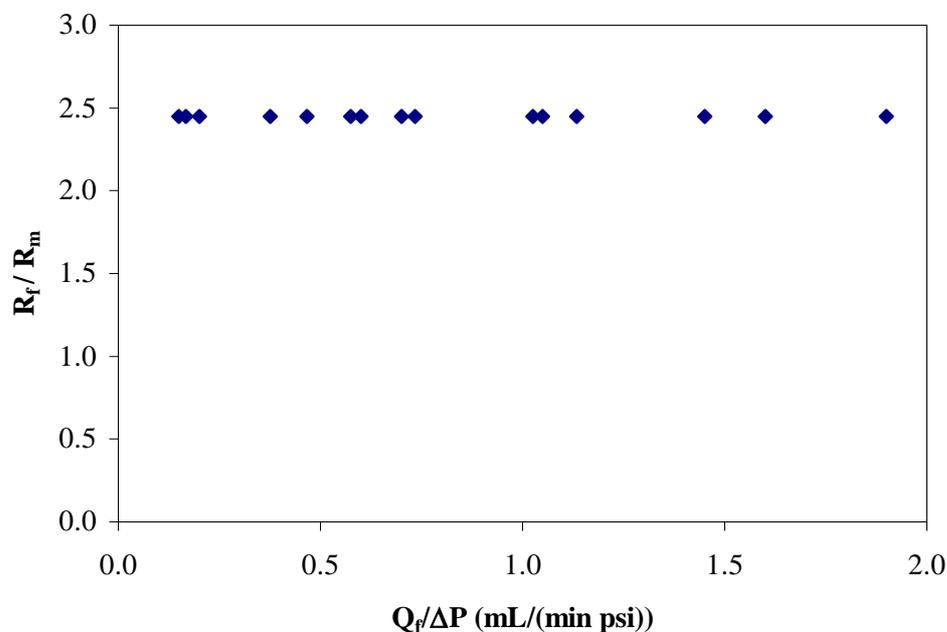


Figura 41. Hidrodinámica del módulo de membrana con hidrolizado.

En cuanto al contenido en nitrógeno, Tabla 34, se observa que se mantiene constante con el tiempo, lo que indica que se alcanza un estado estacionario respecto al paso de nitrógeno por la membrana gracias a que no se adsorbe proteína en la misma.

Respecto a la distribución de pesos moleculares, las muestras de filtrado han sido analizadas por HPLC, Figura 42.

En el cromatograma se comprueba que:

- No aparecen picos a tiempos de retención inferiores a 17.4 min, que corresponde a un peso molecular de 3000, confirmando el tamaño de corte de la membrana.
- Los cromatogramas obtenidos presentan una distribución idéntica, es decir, en el transcurso de la ultrafiltración no se produce una variación en la preferencia de la membrana por dejar pasar unas fracciones u otras.

Queda así comprobado que la operación de ultrafiltración en el módulo de membrana es uniforme y permite el funcionamiento del reactor de membrana, al menos durante el tiempo investigado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 34. Contenido en nitrógeno en el filtrado durante la ultrafiltración a recirculación total para un hidrolizado al 10 %.

t (min)	N (g/L)
30	2.26
45	2.28
60	2.46
75	2.46
90	2.53
105	2.44
120	2.53

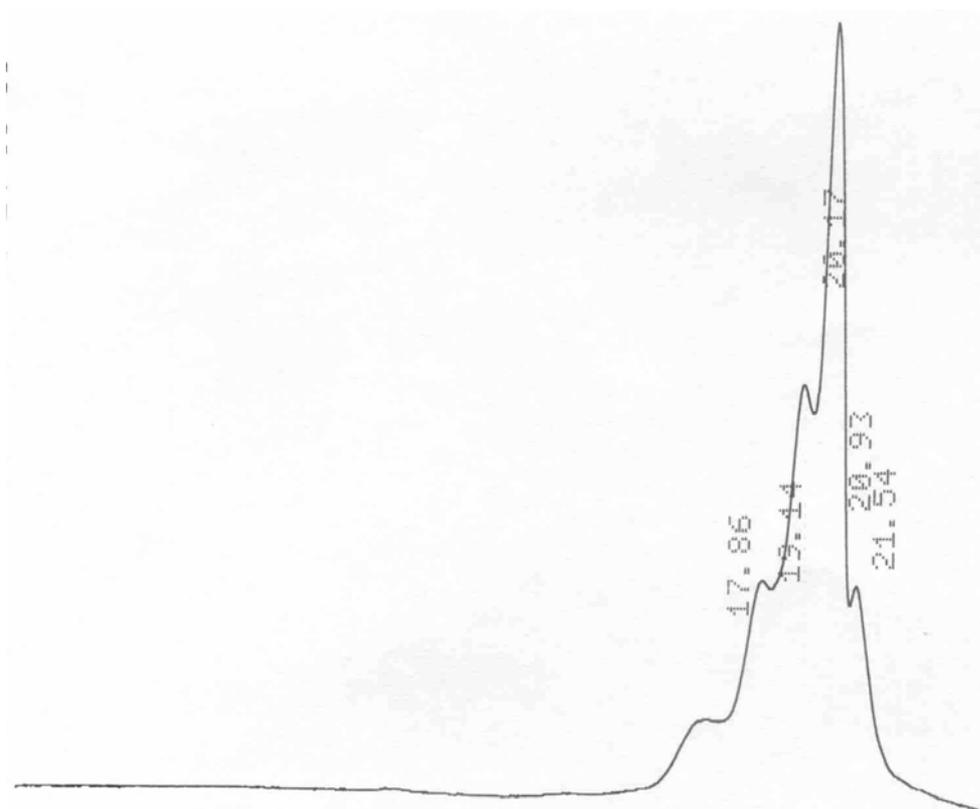


Figura 42. Cromatograma del filtrado durante la ultrafiltración a recirculación total para un hidrolizado al 10 %.

5.9. Reactor de membrana.

Una vez realizados y modelizados los procesos de hidrólisis enzimática en discontinuo de las proteínas del lactosuero con Protex 6 L a 50 °C y pH = 8.5 y de ultrafiltración de un hidrolizado por el módulo de membrana plana de polietersulfona de corte 3 kDa, ya es posible realizar la operación en el reactor de membrana con objeto de compararla con el modo discontinuo.

También se ha demostrado que no se produce fuga de enzima a través de la membrana y que ésta no se desactiva por bombeo o por interacción con la membrana. De esta forma, el proceso en el reactor de membrana es viable porque permite una reutilización continua de la enzima.

Puesto que el objetivo es la producción de hidrolizados con un peso molecular entorno a 500 Da, correspondiente a una presencia mayoritaria de di y tripéptidos, el reactor de membrana deberá operar a unos grados de hidrólisis por encima del 16 %.

El proceso de hidrólisis en el reactor de membrana se ha llevado a cabo en diferentes experiencias en las que se han modificado las variables que determinan su funcionamiento: concentración de proteína inicial en el reactor y de alimentación (s_0), relación enzima/sustrato (E/S) y volumen del reactor (V) que, junto con el caudal de alimentación, que se iguala al caudal de filtrado (Q_f), determina el tiempo de residencia (τ). Los niveles ensayados de estas variables se indican en la Tabla 35.

Tabla 35. Variables ensayadas en el reactor de membrana.

Variable	Valor	Nivel
s_0 (g/L)	25	bajo
	50	alto
E/S	0.01	bajo
	0.03	medio
	0.06	alto
V (L)	1.5	bajo
	2.0	alto

Con objeto de hacer un barrido de los niveles descritos y para poder estudiar la influencia de cada variable por separado se han programado los siguientes experimentos, Tabla 36.

Tabla 36. Experimentos realizados en el reactor de membrana.

Exp	s_0 (g/L)	e_0 (g/L)	E/S	V (L)	N_B (eq/L)
1	50	0.5	0.01	2.0	1.997
2	50	1.5	0.03	2.0	2.012
3	50	3.0	0.06	2.0	1.971
4	25	1.5	0.06	2.0	1.986
5	50	1.5	0.03	1.5	1.986

Así, mediante los experimentos 1 y 2 se estudia la influencia de la relación E/S; mediante los experimentos 3 y 4, la de la concentración en proteína de la alimentación, s_0 ; y mediante los experimentos 2 y 5, la del volumen del reactor, V.

Los experimentos realizados se detallan a continuación.

5.9.1. Experimento 1: $s_0 = 50$ g/L, E/S = 0.01 y V = 2 L.

Durante el tiempo de operación, t, se registra el volumen total filtrado, V_f , y el consumo de NaOH 2 N necesario para mantener el pH constante a 8.5 en el reactor. Igualmente se toman muestras del producto filtrado y se analiza su contenido en nitrógeno, N_f . En la Tabla 37 se recogen los resultados obtenidos durante 8 horas de operación.

La conversión calculada en la Tabla 37 corresponde a la conversión en el proceso continuo, que viene definida por:

$$\text{Conversión} = \frac{N_f}{TN_0 - SN_0} \quad [5.93]$$

donde N_f = concentración de nitrógeno en el filtrado (producto).

TN_0 = concentración total de nitrógeno en la alimentación.

SN_0 = concentración de nitrógeno soluble en la alimentación.

La conversión con el tiempo de operación se representa en la Figura 43. Se observa que se alcanza el estado estacionario, de forma que la conversión permanece prácticamente constante. Como criterio, calculamos el valor de la conversión en estado estacionario como la media de las conversiones medidas a partir de las 5 horas de operación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 37 Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 50 \text{ g/L}$, $E/S = 0.01$ y $V = 2 \text{ L}$.

t (min)	V_f (mL)	Q_f (mL/min)	V_B (mL)	Conversión	N_f (g/L)
22	284		32.1	0.188	8.84
35	428	10.7	42.1	0.252	11.89
65	712	9.5	57.4	0.375	17.68
95	1000	9.6	69.7	0.435	20.53
125	1260	8.7	80.9	0.471	22.21
185	1760	8.3	101.0	0.560	26.42
245	2220	7.7	119.4	0.625	29.47
305	2640	7.0	137.4	0.643	30.32
365	3060	7.0	156.0	0.661	31.16
425	3460	6.7	173.2	0.690	32.53
485	3860	6.7	189.7	0.741	34.95

El volumen de producto filtrado con el tiempo se representa en la Figura 44. La disminución en la pendiente de la curva corresponde a una caída en el caudal de filtrado debida a la colmatación de la membrana. Con objeto de calcular un caudal medio de todo el proceso se realiza una regresión lineal, forzada a pasar por el origen, del volumen de filtrado frente al tiempo. La pendiente de la recta obtenida se corresponde con el caudal medio durante el proceso.

El caudal de filtrado instantáneo se representa en la Figura 45, en la que se observa el efecto provocado por la colmatación de la membrana.

Si se representa volumen de NaOH 2 N necesario para mantener en el reactor el pH a 8.5 frente al tiempo, Figura 46, se observa que, tras un periodo inicial curvo, los datos se ajustan a una línea recta. Esto indica que se alcanza un estado estacionario respecto a la velocidad de rotura de enlaces en el sistema como cabría esperar.

El valor de la pendiente de esta recta será el caudal de base a añadir constantemente en el reactor, Q_B . Así, es posible definir el grado de hidrólisis para el reactor de membrana:

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$X = \frac{Q_B N_B (1 + 10^{pK-pH})}{s_0 Q_f h_T} \quad [5.94]$$

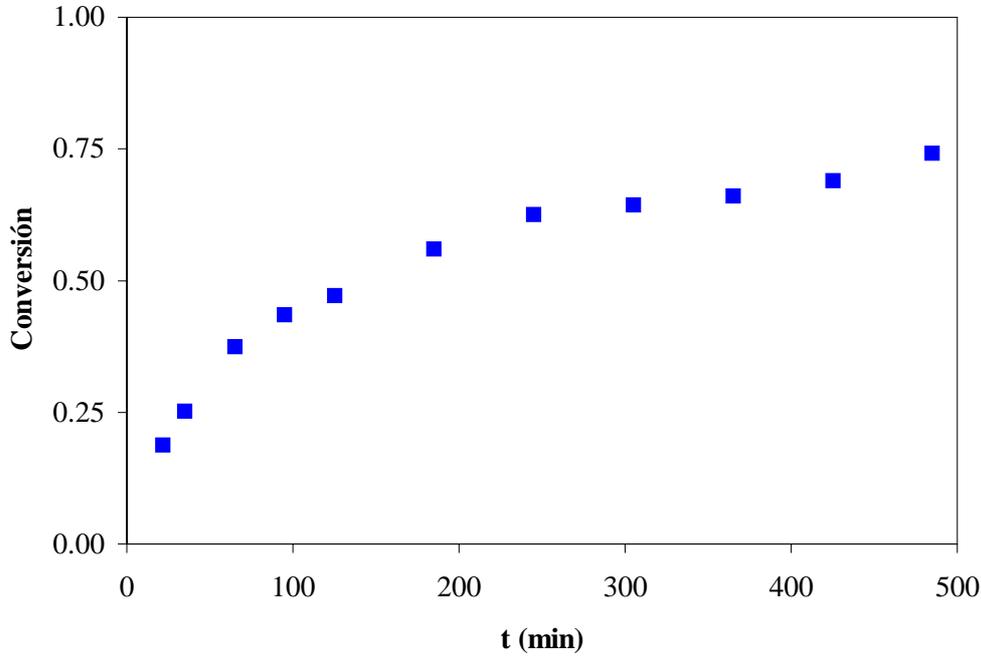


Figura 43. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $V = 2$ L

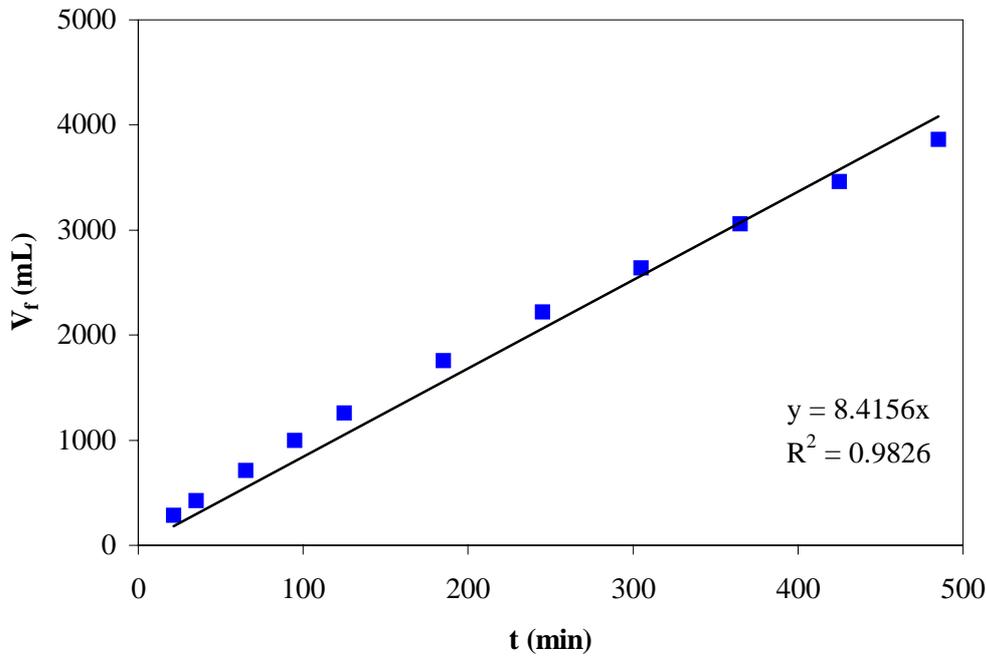


Figura 44. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $V = 2$ L

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

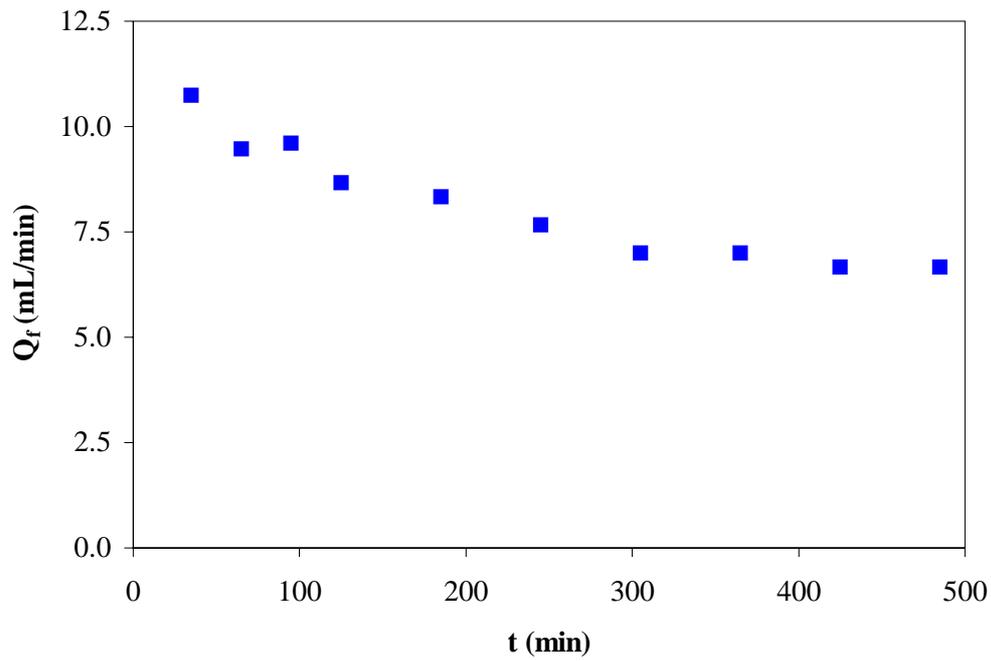


Figura 45. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $V = 2$ L

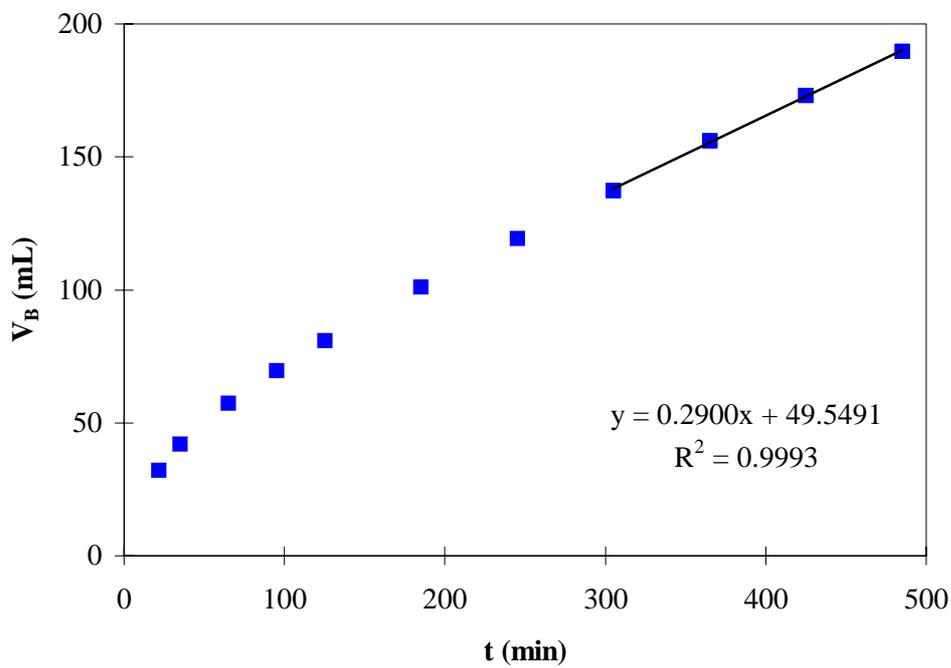


Figura 46. Volumen de NaOH 2 N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $V = 2$ L

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.9.2. Experimento 2: $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$ y $V = 2$ L.

Análogamente a lo descrito en el experimento 1, los resultados obtenidos aparecen a continuación recogidos en la Tabla 38 y en la Figura 47, Figura 48, Figura 49y Figura 50.

Tabla 38. Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$ y $V = 2$ L

t (min)	V_f (mL)	Q_f (mL/min)	V_B (ml)	Conversión	N_f (g/L)
15	200		45.8	0.346	15.26
30	420	14.7	61.4	0.489	21.58
60	820	13.3	83.6	0.587	25.89
120	1640	13.7	121.6	0.668	29.47
180	2440	13.3	156.7	0.713	31.47
240	3220	13.0	189.4	0.770	34.00
300	3960	12.3	221.4	0.799	35.26
360	4680	12.0	250.1	0.766	33.79
420	5380	11.7	278.5	0.773	34.11
480	6060	11.3	309.3	0.782	34.52

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

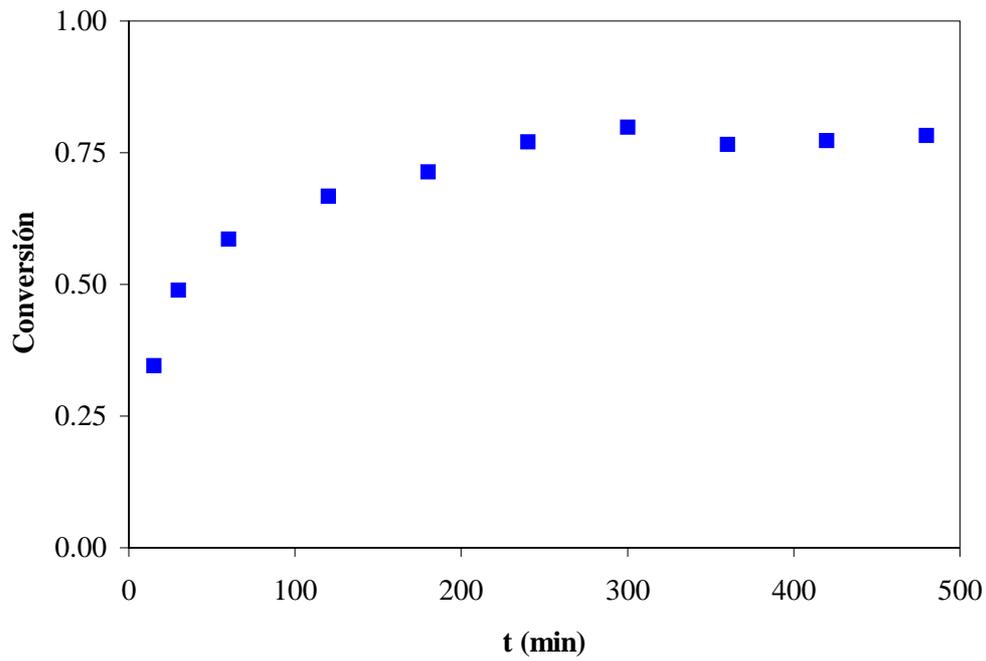


Figura 47. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 2$ L

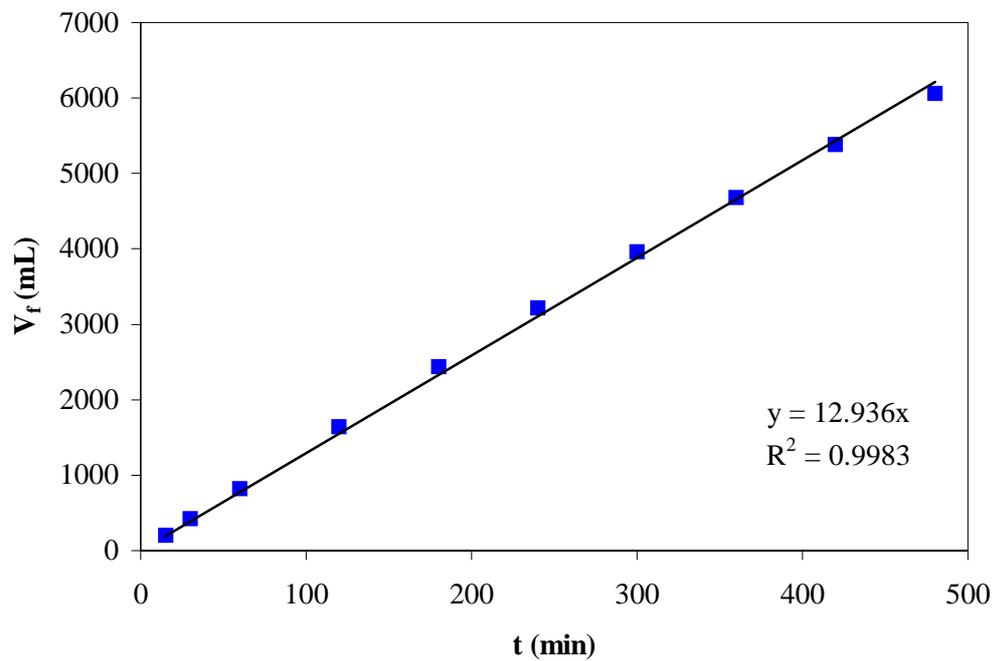


Figura 48. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 2$ L

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

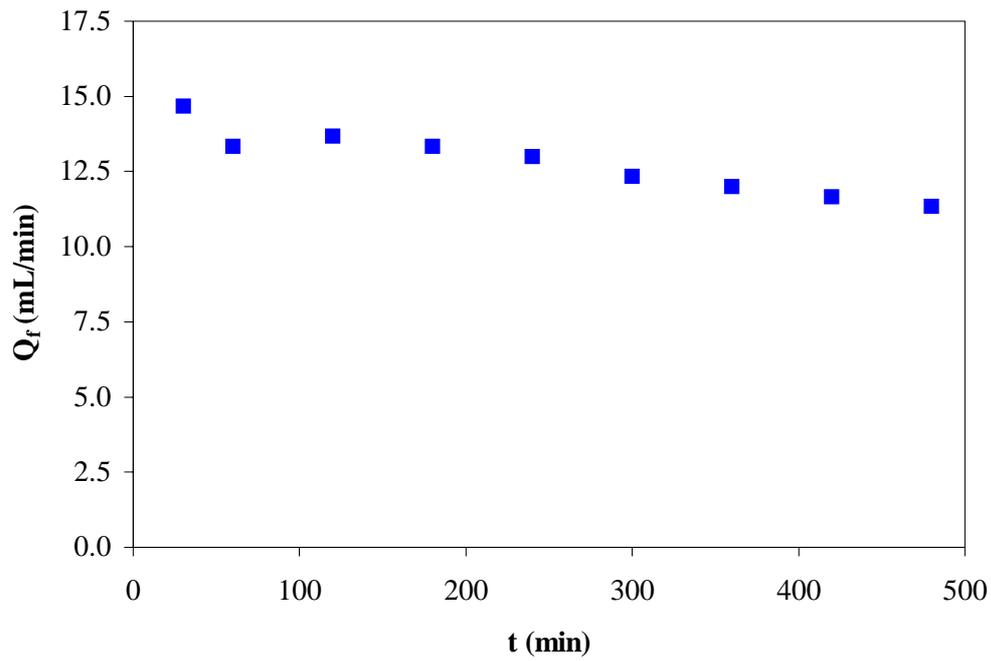


Figura 49. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 2$ L

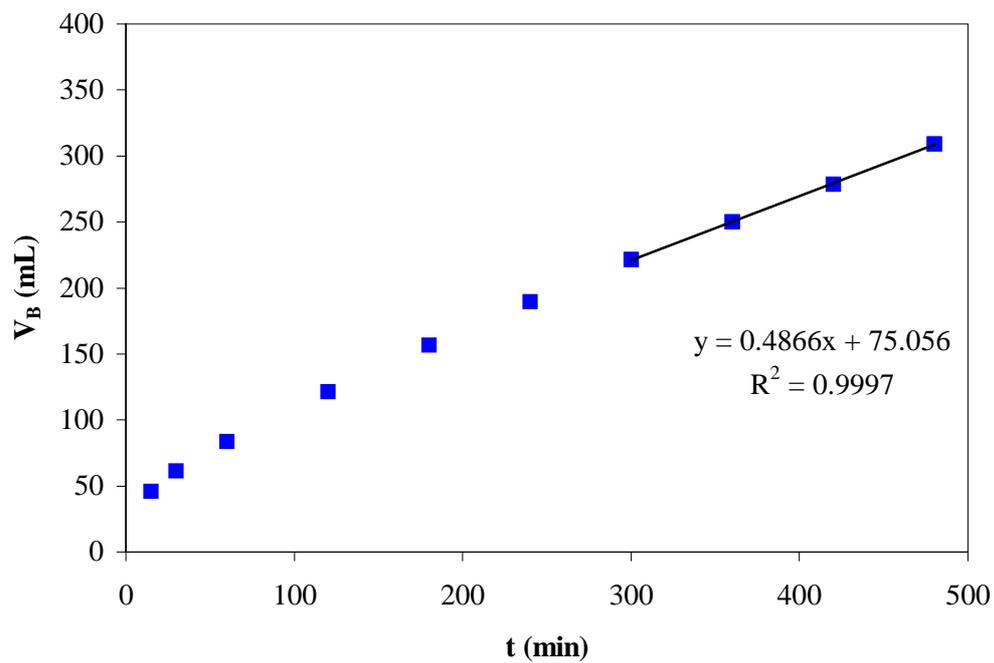


Figura 50. Volumen de NaOH 2 N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 2$ L

5.9.3. Experimento 3: $s_0 = 50$ g/L, E/S = 0.06 V = 2 L

Los resultados de este experimento se indican en la Tabla 39 y se representan en la Figura 51, Figura 52, Figura 53 y Figura 54. En este caso, además, el reactor se ha mantenido operando durante 16 horas para estudiar su estabilidad.

Tabla 39. Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 50$ g/L, E/S = 0.06 y V = 2 L.

t (min)	V _f (mL)	Q _f (mL/min)	V _B (mL)	Conversión	N _f (g/L)
15	140		57.3	0.402	18.00
30	260	8.0	72.0	0.569	25.47
60	500	8.0	91.1	0.646	28.95
120	1040	9.0	121.3	0.656	29.37
180	1600	9.3	148.2	0.761	34.11
240	2140	9.0	175.2	0.752	33.68
300	2660	8.7	201.3	0.738	33.05
360	3160	8.3	226.4	0.851	38.11
420	3660	8.3	251.5	0.848	38.00
480	4140	8.0	275.7	0.818	36.63
540	4620	8.0	300.0	0.865	38.74
600	5060	7.3	321.6	0.940	42.11
660	5460	6.7	343.9	0.877	39.26
720	5860	6.7	364.8	0.884	39.58
780	6260	6.7	386.0	0.915	40.98
840	6640	6.3	408.4	0.953	42.66
900	7020	6.3	431.9	0.790	35.37
960	7400	6.3	452.6	0.915	40.98

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

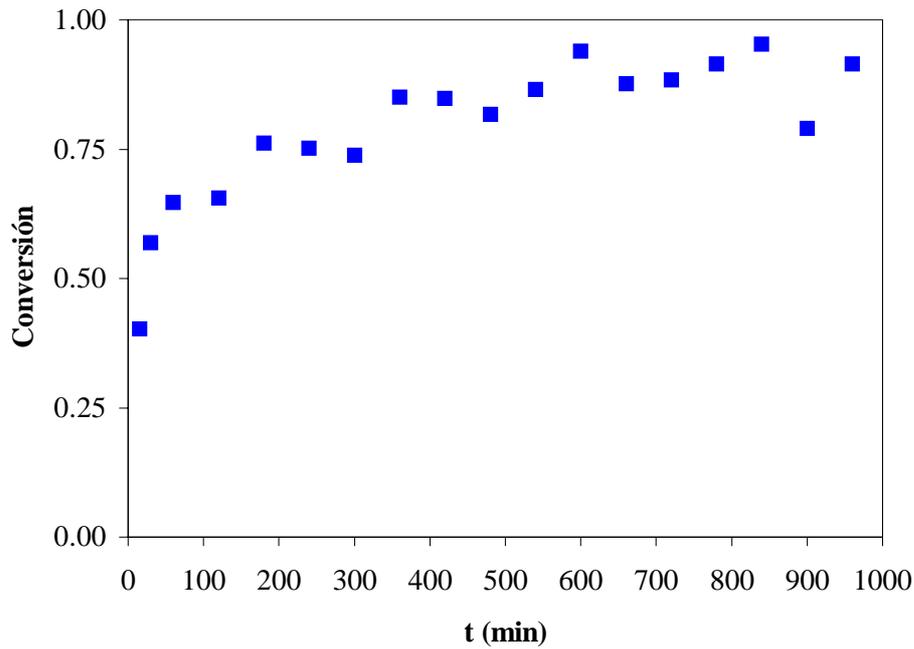


Figura 51. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L

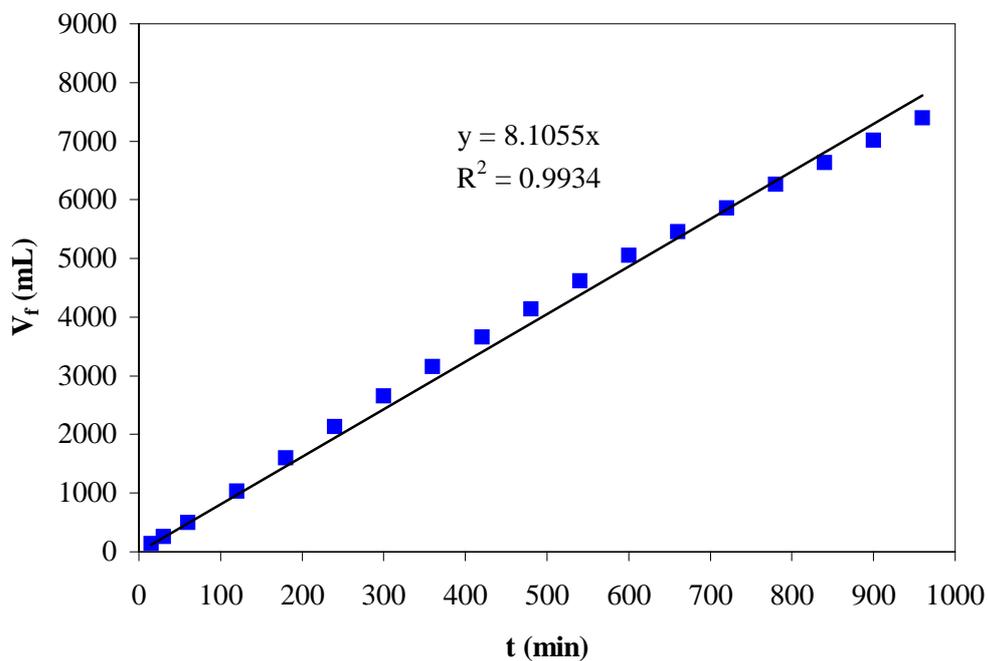


Figura 52. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

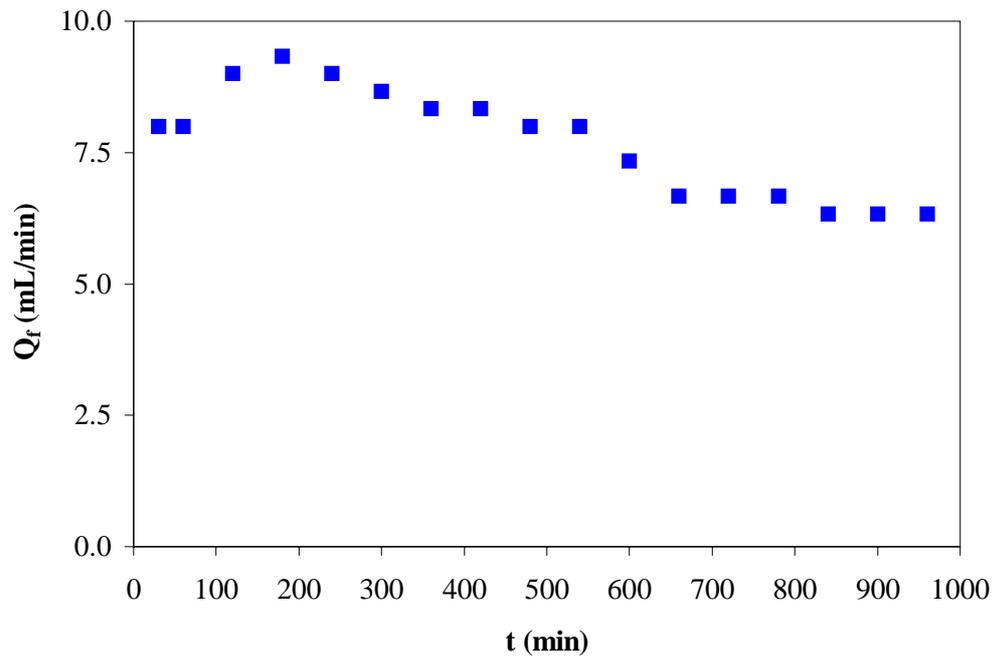


Figura 53 Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L

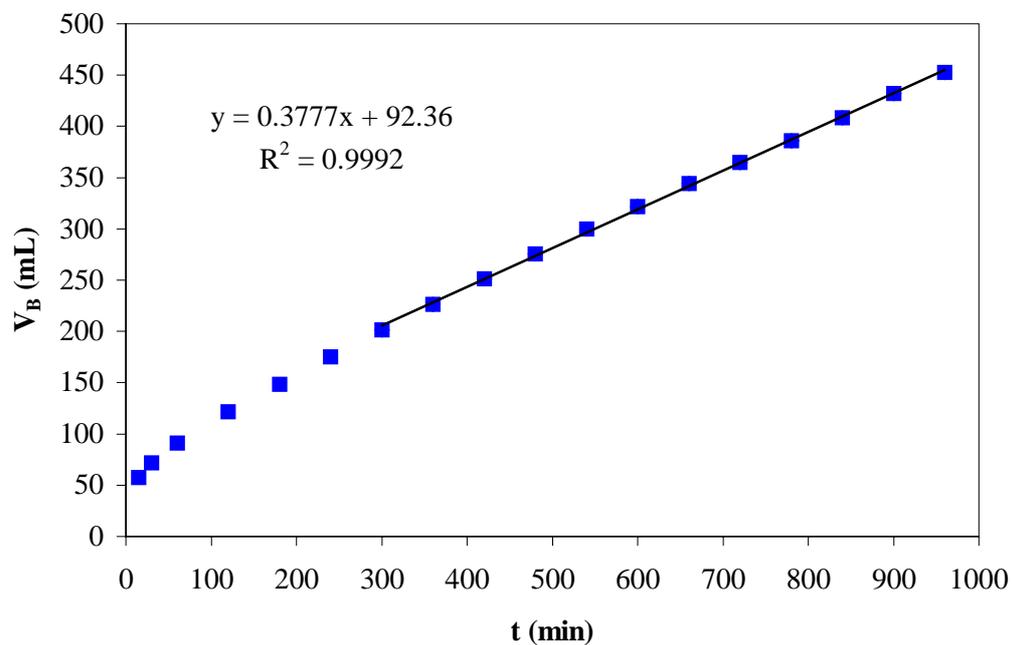


Figura 54. Volumen de NaOH 2N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L

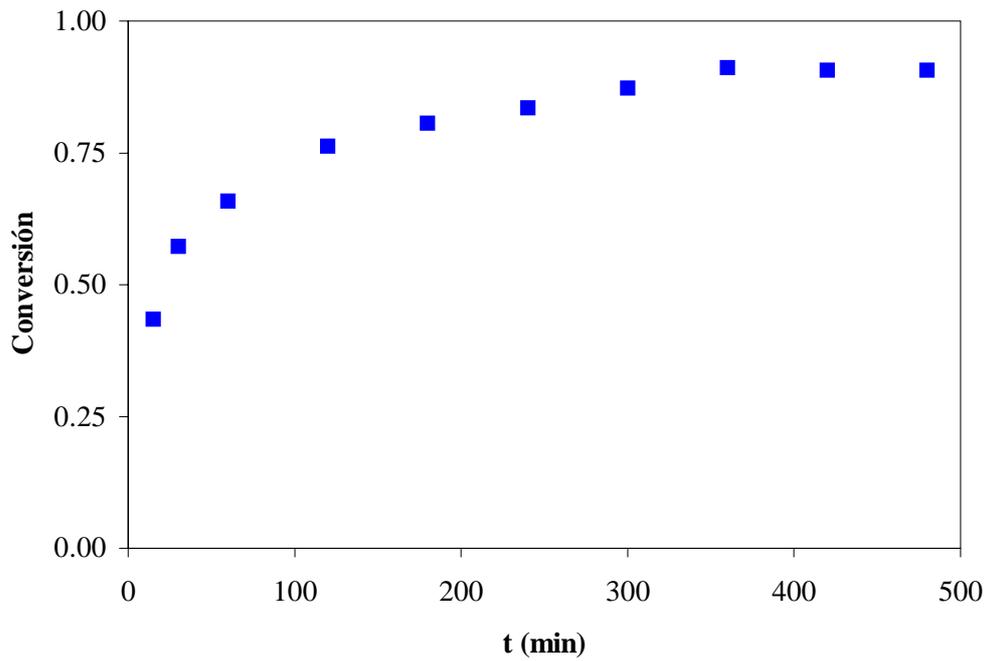
5.9.4. Experimento 4: $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$ V = 2 L

En la Tabla 40 y en la Figura 55, Figura 56, Figura 57 y Figura 58 se recogen los resultados obtenidos cuando la concentración de proteína en la alimentación es 25 g/L.

Tabla 40. Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$ y V = 2 L.

t (min)	V_f (mL)	Q_f (mL/min)	V_B (mL)	Conversión	N_f (g/L)
15	240		31.4	0.434	9.58
30	500	17.3	40.4	0.572	12.63
60	1000	16.7	54.3	0.658	14.53
120	2000	16.7	78.2	0.763	16.84
180	2960	16.0	100.7	0.806	17.79
240	3880	15.3	121.2	0.835	18.42
300	4740	14.3	142.1	0.873	19.26
360	5600	14.3	161.5	0.911	20.11
420	6420	13.7	181.2	0.906	20.00
480	7200	13.0	201.4	0.906	20.00

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



L

Figura 55. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$

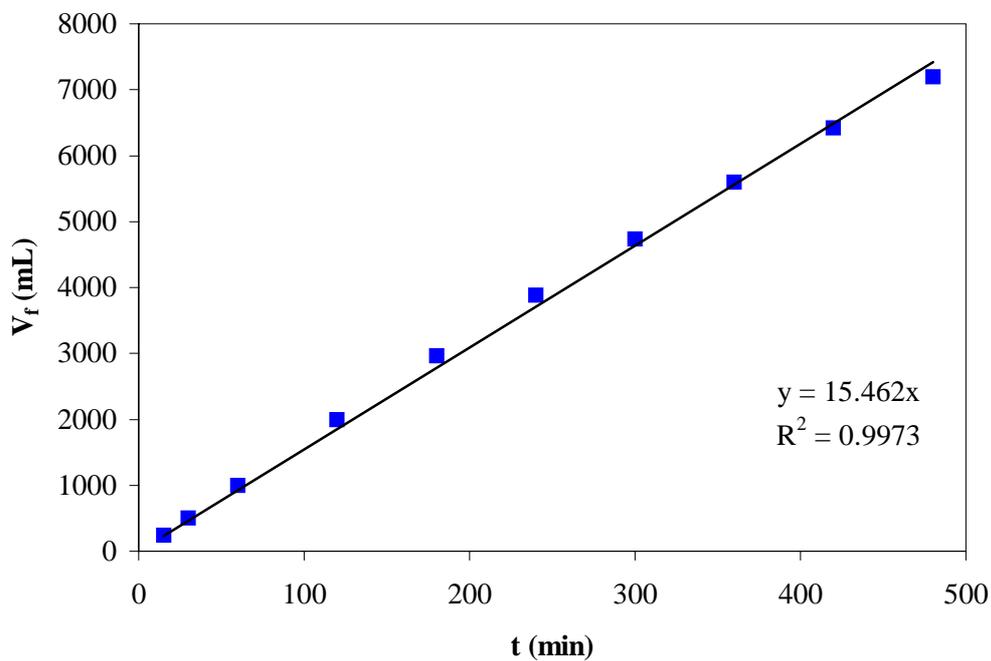


Figura 56. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

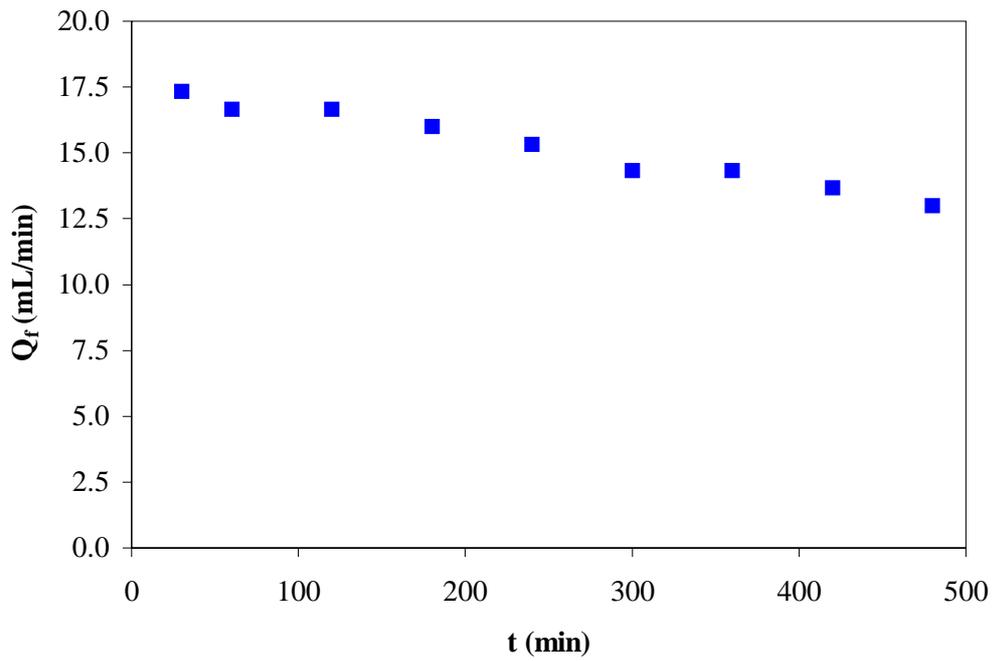


Figura 57. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L

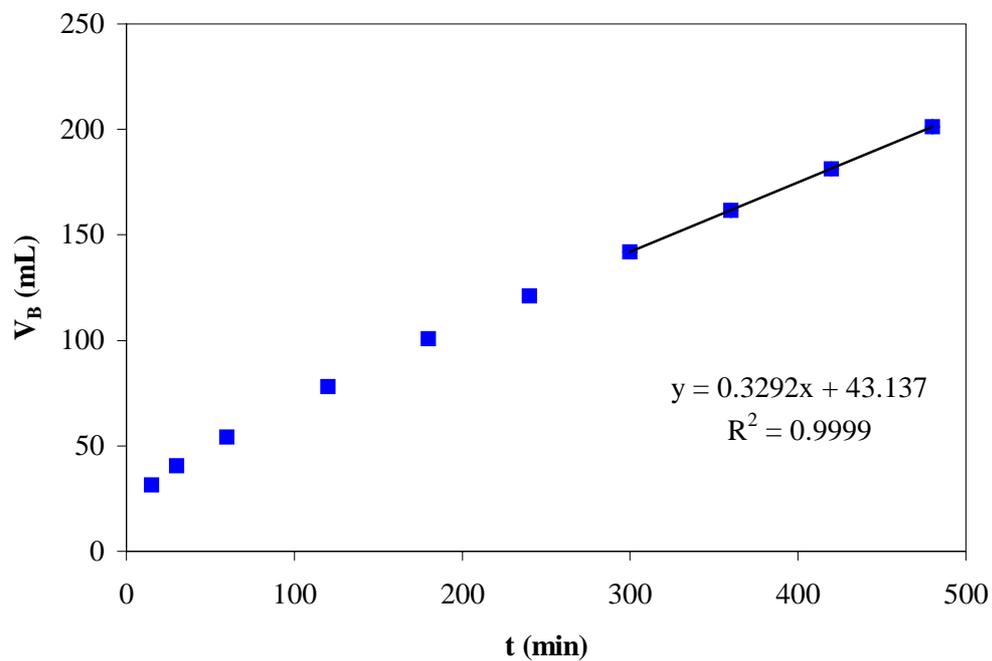


Figura 58. Volumen de NaOH 2 N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 25$ g/L, $E/S = 0.06$, $V = 2$ L

5.9.5. Experimento 5: $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$ V = 1.5 L

Finalmente, los resultados para un volumen de reactor de 1.5 L se indican en la Tabla 41 y se representan en la Figura 59, Figura 60, Figura 61 y Figura 62.

Tabla 41 Funcionamiento del reactor de membrana a $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$ y $V = 1.5$ L.

t (min)	V_f (mL)	Q_f (mL/min)	V_B (mL)	Conversión	N_f (g/L)
15	140		33.5	0.301	13.26
30	280	9.3	45.4	0.477	21.05
60	580	10.0	61.6	0.594	26.21
120	1160	9.7	87.9	0.680	30.00
180	1720	9.3	112.0	0.723	31.89
240	2260	9.0	135.8	0.713	31.47
300	2780	8.7	157.9	0.825	36.42
360	3280	8.3	179.4	0.782	34.53
420	3800	8.7	200.3	0.751	33.16
480	4300	8.3	211.7	0.825	36.42

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

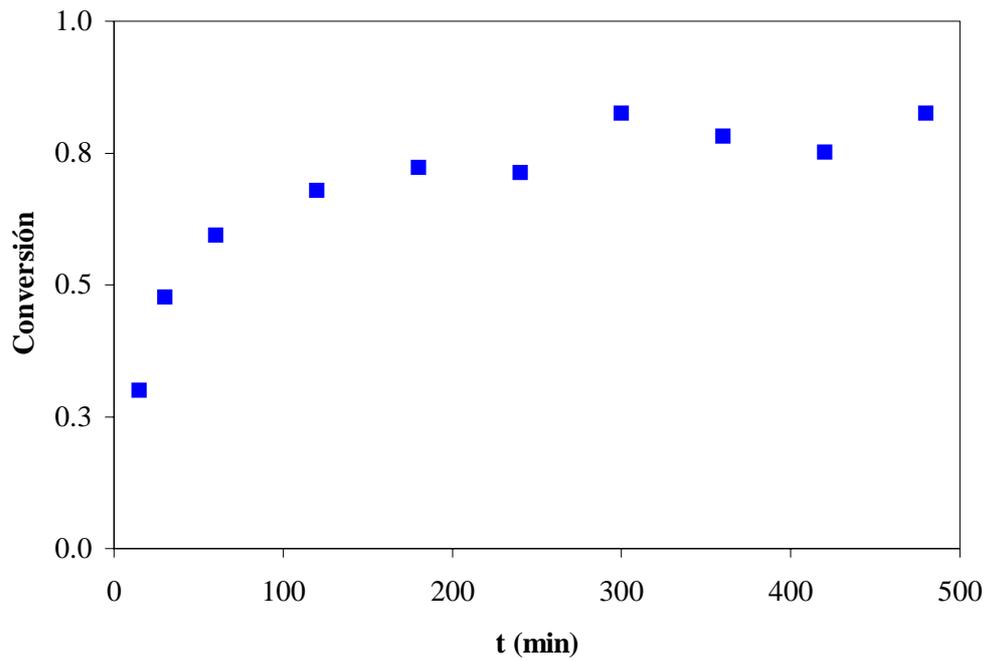


Figura 59. Conversión en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 1.5$ L

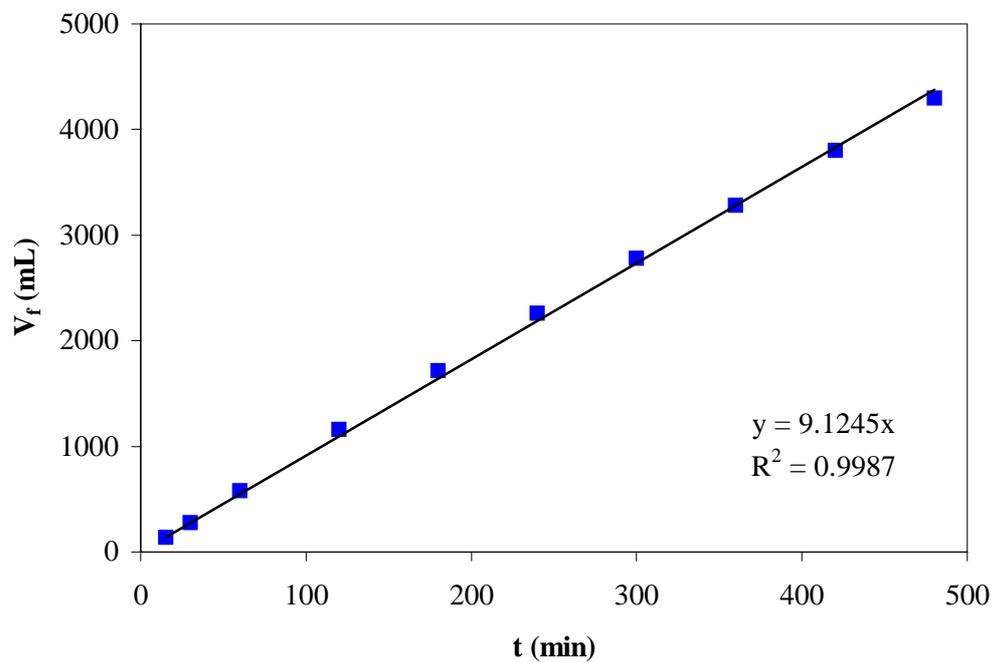


Figura 60. Volumen filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 1.5$ L

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

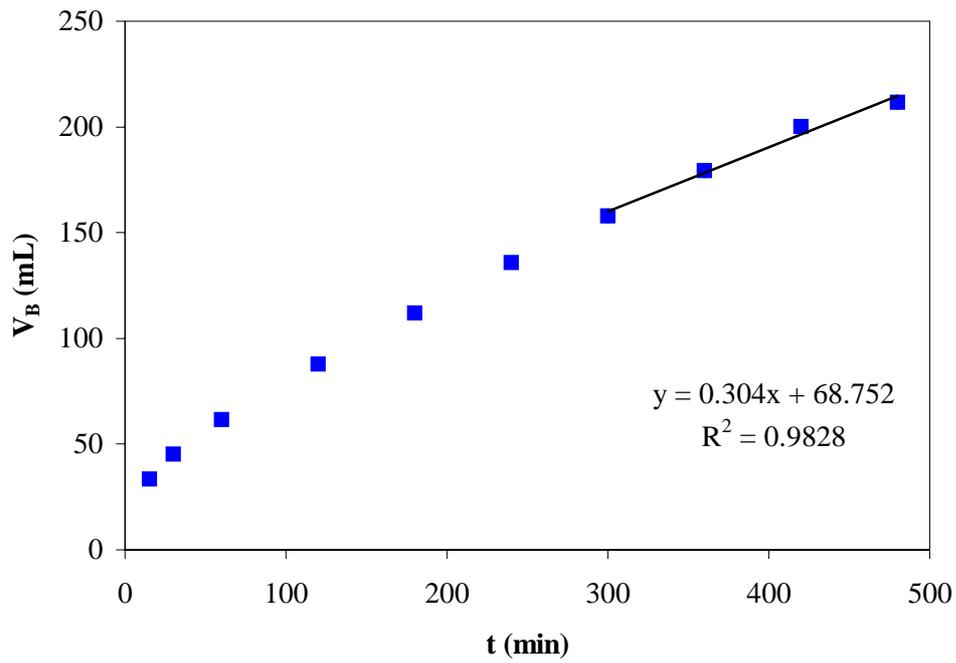


Figura 61. Caudal de filtrado en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 1.5$ L

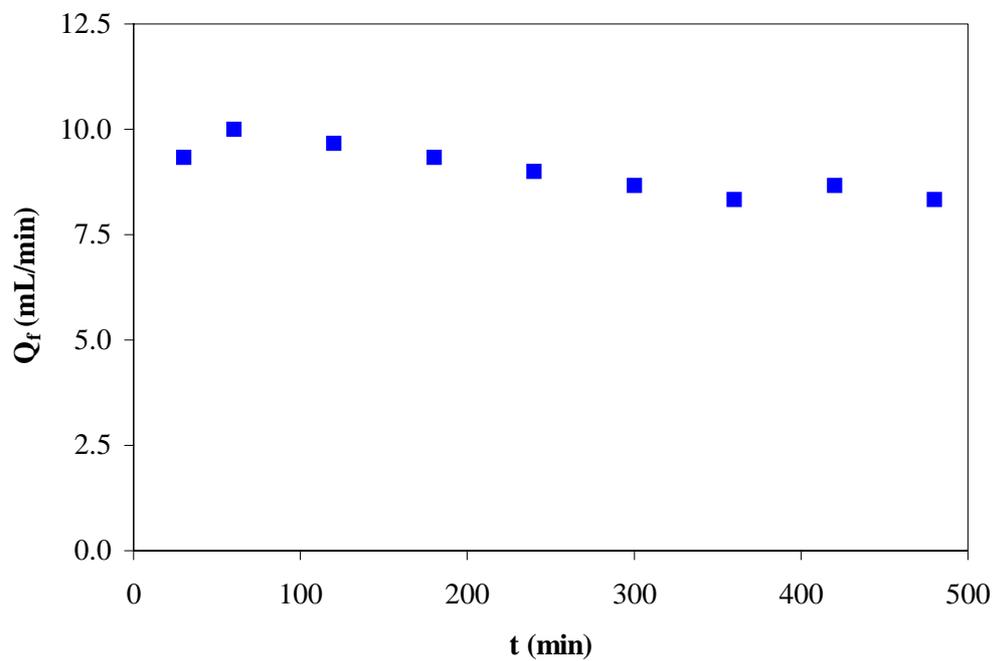


Figura 62. Volumen de NaOH 2 N para mantener el pH constante en el reactor de membrana para $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.03$, $V = 1.5$ L

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de concentración de nitrógeno en el filtrado, conversión, caudal de filtrado, tiempo de residencia, caudal de base añadida, grado de hidrólisis y capacidad en estado estacionario para los experimentos en el reactor de membrana se resumen en la Tabla 42.

Tabla 42. Resultados obtenidos en el reactor de membrana.

Exp	N _f (g/L)	Conversion	Q _f (mL/min)	τ (min)	Q _B (mL/min)	x	Capacidad
1	32.237	0.684	8.4	237.6	0.290	0.167	0.271
2	34.421	0.780	12.9	154.6	0.486	0.184	0.148
3	40.134	0.896	8.1	246.7	0.377	0.223	0.054
4	19.842	0.899	15.4	129.3	0.329	0.206	0.102
5	35.132	0.796	9.1	164.3	0.304	0.161	0.142

Siendo el tiempo de residencia el cociente entre el volumen del reactor y el caudal medio de filtrado:

$$\tau = \frac{V}{Q_f} \quad [5.95]$$

y la capacidad del reactor el nitrógeno producido por unidad de masa de enzima y unidad de tiempo (g de nitrógeno/(g de enzima · min)).

$$\text{Capacidad} = \frac{N_f}{e_0 \tau} \quad [5.96]$$

A la vista de los experimentos 1 y 2, se deduce que un aumento en la relación E/S en el sistema produce un aumento en el grado de hidrólisis y la conversión alcanzados en estado estacionario. Sin embargo, disminuye la capacidad del reactor, puesto que, aunque hay un aumento en la concentración de nitrógeno en el filtrado, éste no compensa la mayor cantidad de enzima empleada.

Considerando los experimentos 3 y 4 se observa que al aumentar la concentración de proteína en la alimentación al reactor, el grado de hidrólisis disminuye, ya que la velocidad de rotura de enlaces será menor. La conversión en estado estacionario no se ve alterada, mientras que la capacidad del reactor aumenta con la concentración de proteína al aumentar el contenido en nitrógeno del hidrolizado filtrado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparando los experimentos 2 y 5, se aprecia que el volumen del reactor y, por tanto, el tiempo de residencia no ejercen una influencia significativa en los parámetros determinados en las condiciones ensayadas.

Por último, mediante el experimento 3 se comprueba que en el reactor no se ha producido una caída en la conversión en estado estacionario tras mantener la operación durante 16 horas. Ésto demuestra la estabilidad del proceso, indispensable para considerar válido el funcionamiento del reactor.

Para comparar los procesos en el reactor discontinuo tanque agitado y en el reactor continuo de membrana se pueden representar los puntos correspondientes a los experimentos del reactor de membrana sobre las curvas de nivel obtenidas en la simulación del reactor discontinuo (Figura 63, Figura 64 y Figura 65) haciendo equivaler tiempo de reacción en discontinuo con tiempo de residencia en continuo.

Se constata que el grado de hidrólisis y la conversión en ambos sistemas toma valores similares ya que, al tratarse de procesos de tan distinta configuración, las diferencias en los valores calculados no son significativas.

Sin embargo, los valores obtenidos para la capacidad en el reactor de membrana son en todos los casos más satisfactorios que en el reactor discontinuo. Se observa que la capacidad se incrementa de 5 a 6 veces al pasar de un modo de operación a otro, lo que refleja la mayor eficiencia del reactor de membrana debida a una mejor utilización de la enzima. Es más, en el reactor discontinuo sólo se ha tenido en cuenta el tiempo de reacción, cuando, al sumar los tiempos de maniobra, la capacidad sería aun menor y la diferencia mayor.

Teniendo en cuenta este resultado, la estabilidad demostrada de la operación y las ventajas inherentes a todo proceso continuo respecto al discontinuo, queda probada la conveniencia de realizar la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero en un reactor continuo de membrana.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

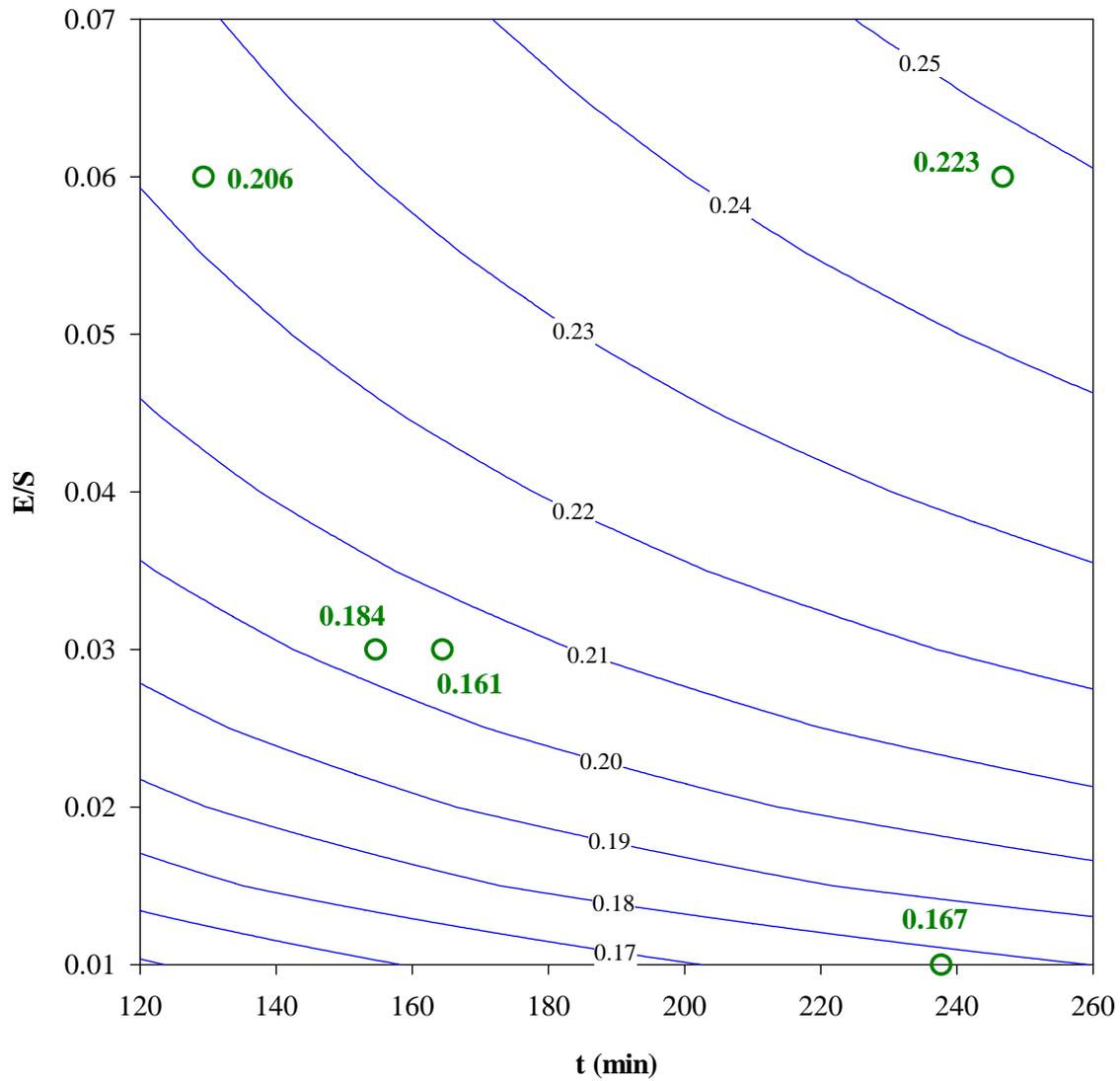


Figura 63. Grado de hidrólisis comparado del reactor discontinuo (curvas de nivel) y del reactor de membrana (puntos).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

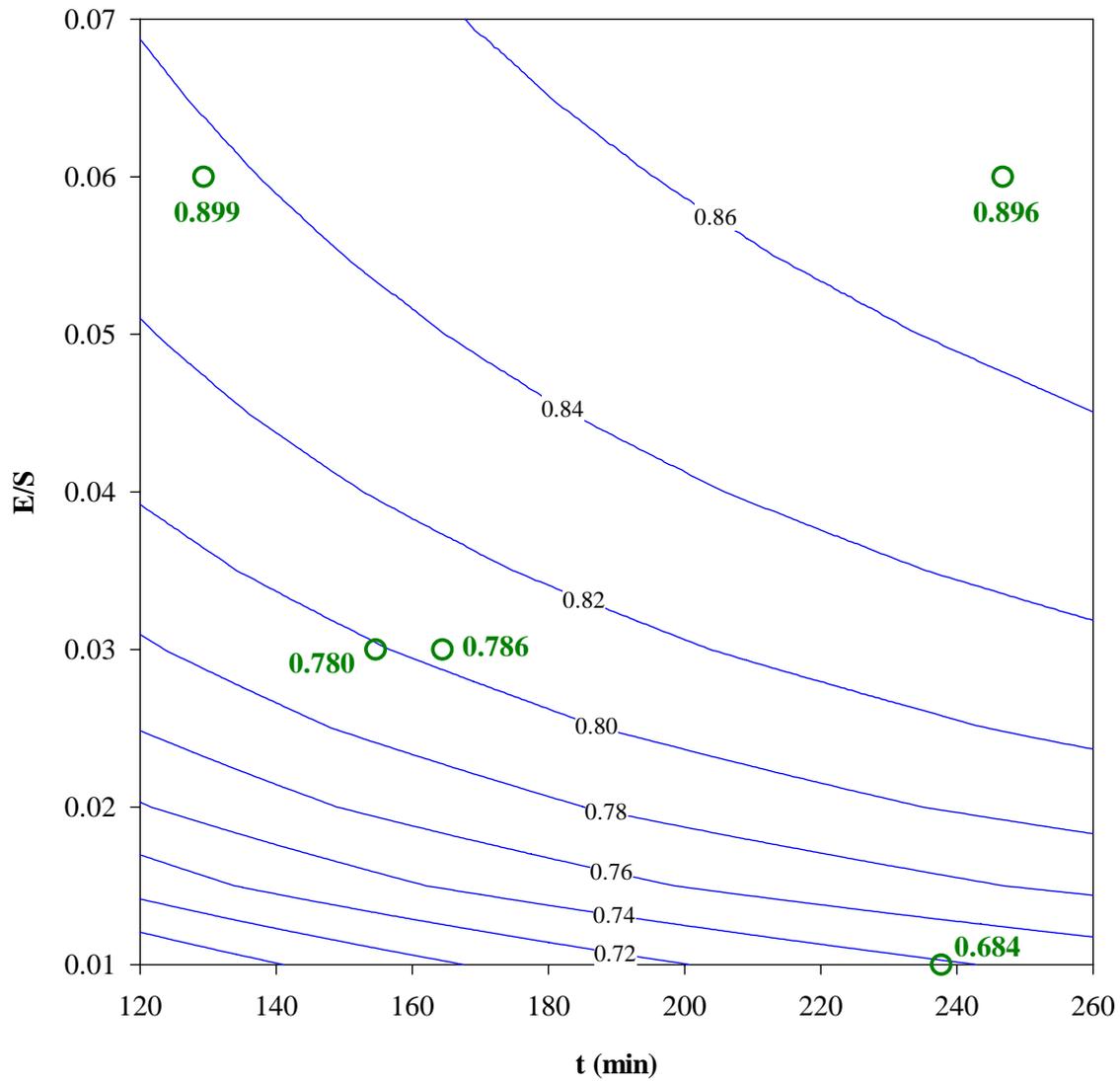


Figura 64. Conversión comparada del reactor discontinuo (curvas de nivel) y del reactor de membrana (puntos).

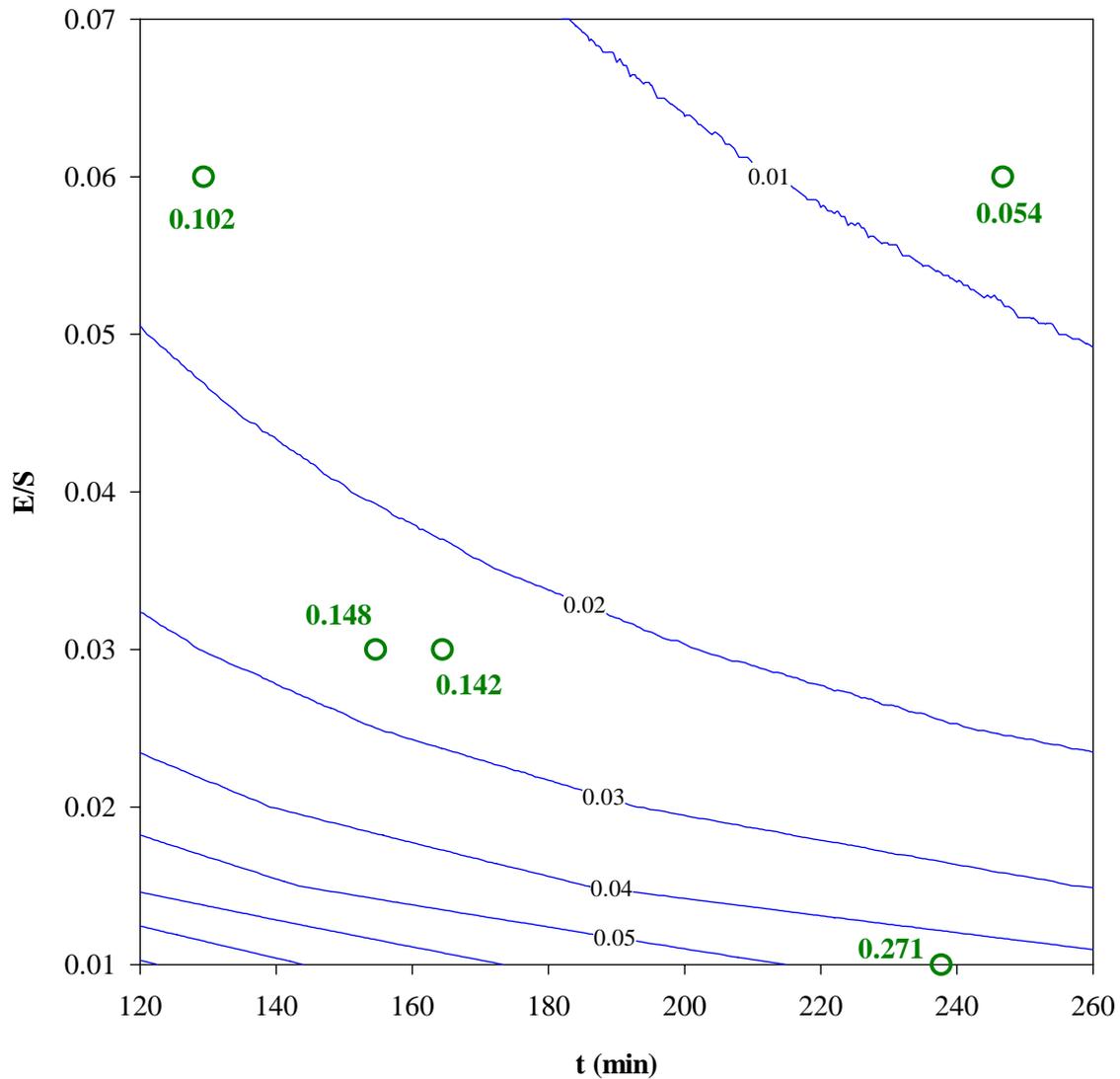


Figura 65. Capacidad comparada del reactor discontinuo (curvas de nivel) y del reactor de membrana (puntos).

5.10. Caracterización del producto.

Para caracterizar el hidrolizado de proteínas séricas obtenido en el reactor de membrana es necesario conocer su distribución de pesos moleculares y la reducción del potencial antigénico sufrida respecto de la proteína nativa.

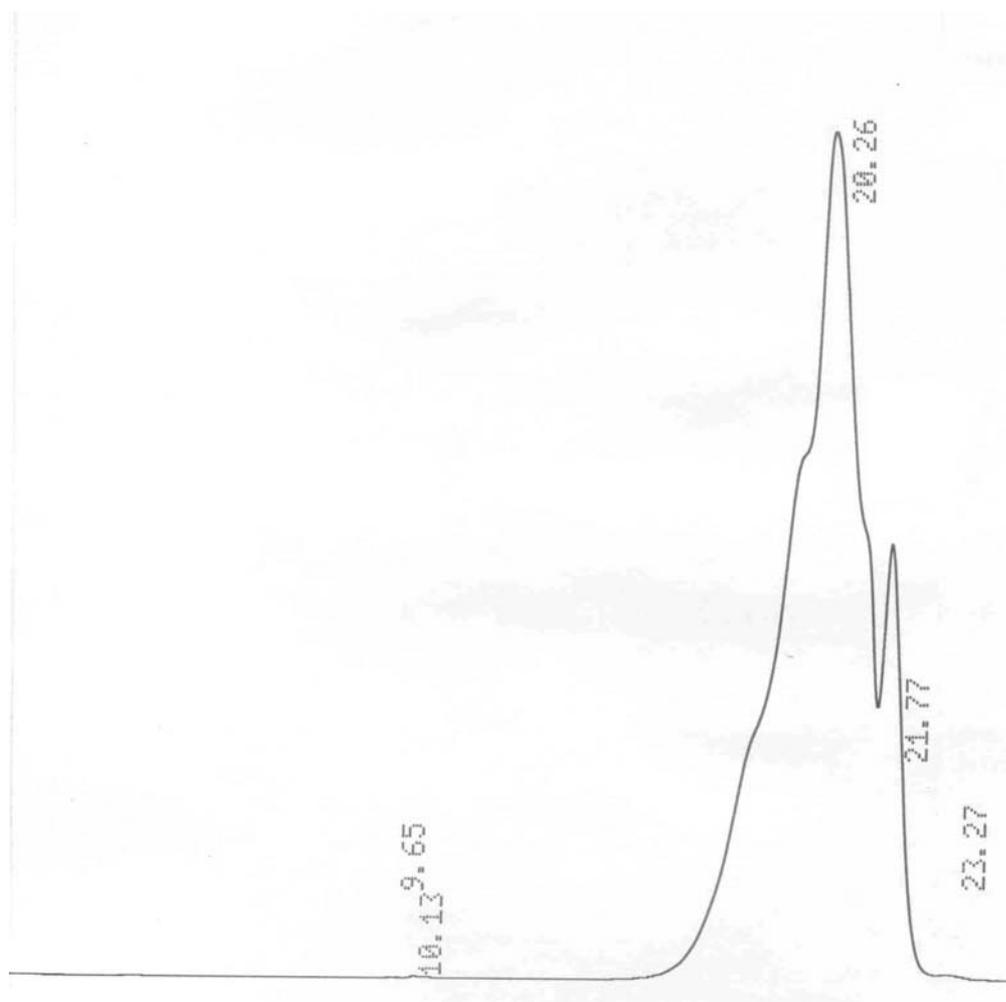


Figura 66. Cromatograma de un hidrolizado obtenido en el reactor de membrana. Condiciones de operación: $s_0 = 50 \text{ g/L}$, $E/S = 0.06$, $V = 2 \text{ L}$.

El cromatograma de la Figura 66 pertenece al hidrolizado obtenido en el experimento 3 (16 horas de operación estable) descrito en el apartado 5.8. Los cromatogramas del resto de hidrolizados presentan una distribución similar. Se observa que la mayor fracción de péptidos se sitúa en torno a un tiempo de retención $t_R = 20.26 \text{ min}$, que corresponde a un peso molecular de 330 Da. Es decir, el hidrolizado obtenido está formado principalmente por di y tripéptidos.

La determinación de la reducción en la alergenicidad del hidrolizado se realiza mediante un test ELISA sobre una muestra en polvo del mismo. El hidrolizado en polvo, con un 74.6 % en proteína, se obtiene mediante el secado por atomización del hidrolizado líquido en las siguientes condiciones:

- Temperatura de entrada del aire a la cámara de secado = 143 °C.
- Temperatura de salida del aire de la cámara de secado = 94 °C.
- Caudal de aire de secado = 29 m³/h.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Caudal de aire comprimido de atomización = 600 L/h.

Si consideramos que la proteína nativa contiene 1000 mg/g de proteína alergénica, el hidrolizado resulta con un contenido en proteína alergénica residual de 0.346 mg/g, lo que supone una reducción del 99.97 %. Esta reducción es comparable a la medida en un hidrolizado comercial analizado suministrado por MD Foods (Viby, Dinamarca) que presenta una reducción del 99.96 %.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación que se describe en esta Memoria se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- De los preparados enzimáticos comerciales ensayados, la proteasa bacteriana Protex 6L ha resultado la más eficaz a $\text{pH} = 8.5$ y $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$ para la hidrólisis de las proteínas del lactosuero.
- Esta enzima no presenta desactivación en presencia de sustrato. Tampoco se aprecia desactivación ocasionada por el bombeo. No se ha detectado pérdida de actividad enzimática por adsorción de la enzima a la membrana ni por fuga a su través.
- El seguimiento y control continuo de la hidrólisis enzimática de proteínas puede realizarse mediante el consumo de agente neutralizante necesario para mantener constante el pH en el reactor de hidrólisis. Para ello es necesario determinar el pK medio de los grupos liberados en la hidrólisis.

$$x = \frac{M_B (1 + 10^{\text{pK}-\text{pH}})}{M_P h_T}$$

- El seguimiento y control del proceso hidrolítico de proteínas puede llevarse a cabo mediante medidas del descenso de la temperatura de congelación del producto obtenido. Para ello es necesario determinar el pK medio de los grupos liberados en la hidrólisis y realizar una calibración previa del método en las condiciones de operación del proceso.

$$\Delta T = K_f \left(1 - A_\phi \sqrt{b_0 + \frac{s_0 h_T x}{1 + 10^{\text{pK}-\text{pH}}}} \right) \left(m_0 + i_0 + b_0 + s_0 h_T x \left(\frac{2 + 10^{\text{pK}-\text{pH}}}{1 + 10^{\text{pK}-\text{pH}}} \right) \right)$$

- El pK medio de los grupos α -amino liberados en la hidrólisis en condiciones alcalinas depende del pH de trabajo.

$$\text{pK} = \text{pH} - \log_{10} \left(\frac{1}{\sum_i \frac{C_i / C_T}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pKi}}}} - 1 \right)$$

- Se demuestra teóricamente que el pK medio adecuado puede calcularse a partir de los equivalentes/L de base consumidos en el desplazamiento del equilibrio de protonación de los grupos liberados por la hidrólisis con el pH . El método que se propone para ello consiste

6. CONCLUSIONES

en la valoración en el rango alcalino de la proteína de partida y de la proteína parcialmente hidrolizada.

- La aplicación de esta metodología a la hidrólisis de proteínas del lactosuero con Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C han permitido calcular el valor del pK medio adecuado para este sistema.

$$pK = 4.5609 + 0.3275 \text{ pH}$$

$$pK (\text{a pH} = 8.5) = 7.34$$

- El modelo propuesto para el cálculo del pK puede extenderse a cualquier proceso de hidrólisis que implique la aparición de grupos funcionales parcialmente protonizables en las condiciones de operación, con objeto de seguir su cinética mediante el consumo de agente neutralizante necesario para mantener constante el pH.
- El peso molecular medio de los péptidos obtenidos se relaciona con el grado de hidrólisis según la siguiente expresión:

$$PM_x = \frac{1 + 18h_T x}{\frac{1}{PM_m} + h_T x}$$

- El índice de solubilidad en TCA, SN, depende del grado de hidrólisis alcanzado y es independiente de las condiciones de operación. En el caso de la hidrólisis de las proteínas del lactosuero con Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C la equivalencia entre grado de hidrólisis y nitrógeno soluble viene dada por

$$SN = -762.34 x^2 + 517.88 x + 7.3339$$

- La cinética de la hidrólisis de proteínas séricas con la enzima bacteriana Protex 6L a pH = 8.5 y T = 50 °C se ajusta a la ecuación de velocidad:

$$s_0 \frac{dx}{dt} = k f_{\text{reactividad}} f_{\text{accesibilidad}} (x_{\text{max}} - x) e_0$$

con $x_{\text{max}} = 0.35$

$$f_{\text{accesibilidad}} = \frac{3}{n_x^{1/3}} + \frac{1}{n_x} - \frac{3}{n_x^{2/3}}, \quad n_x = \frac{n_0 (1-x)}{1+n_0 x}, \quad n_0 = 148$$

$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 4.274 \exp(-39.92 x)$$

$$x < 0.025$$

6. CONCLUSIONES

$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 1.841 - 12.087 x \qquad 0.025 < x < 0.13$$

$$k \cdot f_{\text{reactividad}} = 3.585 \exp(-20.04 x) \qquad x > 0.13$$

- De acuerdo con la ecuación cinética obtenida, la variable intensiva del tratamiento enzimático es e_0t/s_0 , que permite optimizar las condiciones de operación necesarias para obtener un determinado grado de hidrólisis.
- La realización de la hidrólisis en un reactor de membrana con módulo de ultrafiltración tangencial de polietersulfona de 3000 Da, permite incrementar la capacidad del proceso de 5 a 6 veces respecto a la obtenida en el reactor discontinuo.
- A altos caudales de recirculación, el reactor de membrana es estable más de 16 h.
- Los hidrolizados obtenidos cumplen las especificaciones necesarias para ser incluidos en la formulación de dietas enterales: estrecha distribución de pesos moleculares, peso molecular medio por debajo de 500 Da y reducción del poder antigénico del 99.97 % respecto a la proteína nativa.

7. NOMENCLATURA

7. NOMENCLATURA

A	Pendiente de la relación lineal pK-pH, ec [5.29]
A	Actividad enzimática (mol/g)
AE	Complejo acilenzima, ec [5.68]
b0	Base añadida para ajustar el pH al pH de hidrólisis (m)
Bs	Consumo de base en la valoración de la proteína nativa (M)
Bx	Consumo de base en la valoración de la proteína parcialmente hidrolizada (M)
BV	Valor biológico de la proteína (%)
CB	Concentración de base (M)
CF	Concentración total de grupos protonados y no protonados (M)
Ci	Concentración de un determinado grupo α -amino liberado (M)
CT	Concentración total de enlaces amido hidrolizados (M)
D	Digestibilidad (%)
De	Diámetro asignable a un enlace (m)
Dp	Diámetro asignable a la proteína (m)
E	Concentración de enzima activa (g/L)
E/S	Relación enzima/sustrato
e0	Concentración inicial de enzima (g/L)
F	Grupos no protonados, laterales y terminales
FH+	Grupos protonados, laterales y terminales
hT	Enlaces peptídicos en la proteína (mol/g)
I	Fuerza iónica (molal)
i0	Concentración inicial de especies no proteicas (m)
K	Constante de equilibrio para la desprotonación del grupo amido (M)
k	Constante cinética, ec [5.78]

7. NOMENCLATURA

Kf	Constante crioscópica (K/molal)
KM	Constante de Michaelis-Menten (g/L)
m	molalidad (mol/kg)
m0	Concentración inicial de la proteína (m)
MB	Base añadida (mol)
mD	Masa de disolvente (kg)
Me	Masa de enzima (g)
MP	Masa de proteína (g)
Mx	Enlaces amido hidrolizados (mol)
N	Contenido en nitrógeno (g/L)
n0	Número de enlaces en la proteína
NB	Normalidad de la base (eq/L)
NPN	Nitrógeno no proteínico (g/L)
NPU	Utilización neta de la proteína (%)
nx	Número de enlaces por péptido en cualquier instante
P	Caída de presión (psi)
Pe	Presión de entrada o de alimentación (psi)
PER	Eficiencia proteica (%)
Pf	Presión de filtrado (psi)
pI	Producto iónico del agua
PM	Peso molecular (Da)
PMA	Peso molecular medio por aminoácido en la proteína (g/mol)
Pmi	Peso molecular del aminoácido (Da)
PMm	Peso molecular medio de la proteína (g/mol)
PMx	Peso molecular medio de una cadena peptídica (g/mol)

7. NOMENCLATURA

P-NH ₂	Grupo amino terminal no protonado
P-NH ₃ ⁺	Grupo amino terminal protonado
Ps	Presión de salida o de retenido (psi)
PT	Presión transmembrana (psi)
Q _f	Caudal de filtrado (L/h)
Q _r	Caudal de retenido (L/h)
R _f	Resistencia de fouling de la membrana (psi min/mL)
R _m	Resistencia intrínseca de la membrana (psi min/mL)
R _p	Resistencia de la capa de polarización de la membrana (psi min/mL)
S	Concentración de sustrato (g/L)
s ₀	Concentración inicial de proteína (g/L)
SN	Nitrógeno soluble
SN ₀	Nitrógeno soluble en la proteína nativa
T	tiempo de reacción (min)
T	Descenso crioscópico
TN	Nitrógeno total
t _R	Tiempo de retención (min)
V	Volumen de reacción (L)
V ₀	Volumen inicial de la solución (L)
VB	Volumen de base (L)
WPC	Concentrado de proteínas del lactosuero
x	Grado de hidrólisis
x _{ap}	Grado de hidrólisis aparente, ec [4.2]
x _{max}	Grado de hidrólisis máximo

Letras griegas

7. NOMENCLATURA

α	Grado de disociación, ec [4.4]
ϕ	Coeficiente osmótico, ec [4.6]
γ	Coeficiente de actividad
μ	Centro de la distribución, ec [5.27]
σ	Desviación estándar, ec [5.27]
τ	Tiempo de residencia (min)

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen J (1976). Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.* 24: 1090-1093.
- Adler-Nissen J (1978 a). Enzymatic modification of corn gluten. United States Patent 4100151 (para Novo Industri A/S, Dinamarca).
- Adler-Nissen J (1978 b). Hydrolysis of soy protein. United States Patent 4100024 (para Novo Industri A/S, Dinamarca).
- Adler-Nissen J y Olsen H S (1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *Functionality and Protein Structure* (Pour A, ed.). American Chemical Society, Washington.
- Adler-Nissen J (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
- Akuzawa R, Ito O y Yokoyawa K (1985). Degradation of casein by crystalline low-temperature-active proteinase from *Streptococcus lactis*. *Jpn J. Zootechnol. Sci.* 56(1): 56-60.
- Aunstrup K (1980). *Proteinases. Microbial enzymes and bioconversions*. Academic Press, London: 49-114.
- Baró L, Guadix E M, Martínez-Augustin O, Boza J J y Gil A (1995). Serum amino acid concentrations in growing rats fed intact protein versus enzymatic protein hydrolysates based diets. *Biol. Neonate* 68: 55-61.
- Boudrant J y Cheftel C (1976). Continuous proteolysis with a stabilized protease. I, II. *Biotechnol. Bioeng.* 18: 1719-1749.
- Boza J J, Jiménez J, Martínez O, Suárez M D y Gil A (1994). Nutritional value and antigenicity of two milk protein hydrolysates. *J. Nutr.* 124: 1978-1986.
- Boza J J, Martínez-Augustin O, Baró L, Suárez M D y Gil A (1995). Protein versus enzymatic protein hydrolysates. Nitrogen utilization in starved rats. *Br. J. Nutr.* 73: 65-71.
- Bressollier J M, Petit R y Julien R (1988). Enzyme hydrolysis of plasma proteins in CSTR UF reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 650-658.
- Camacho F, Bravo V y Páez M P (1988). Influencia de la desnaturalización de la enzima en la cinética enzimática. *Afinidad* 45(418): 506-508.

- Camacho F, González-Tello P, Jurado E y Guadix E M (1992). Hidrólisis enzimática de Lactoalbúmina. *An. Quim.* 568-572.
- Camacho F, González-Tello P, Páez M P, Márquez M C y Fernández V (1993). Hidrólisis de caseína con Alcalasa. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 33(1): 59-70.
- Camacho F, González-Tello P y Guadix E M (1998). Influence of enzymes, pH and temperature on the kinetics of whey protein hydrolysis. *Food Sci. Technol. Int.* 4: 79-84.
- Camus M C, Laporte J C y Pcholle P (1980). Protéolyse in vitro de caséine et de gluten par les enzymes pancréatiques. *Unité de recherches sur la nutrition et l'alimentation*: 1025-1039.
- Casella M A y Whitaker J R (1990). Enzymatically and chemically modified zein for improvement of functional properties. *J. Food Biochem.* 14: 453-464.
- Castro S, Vazquez-Peyronel D y Cantera A M B (1996). Proteolysis of whey proteins by a *Bacillus subtilis* enzyme preparation. *Int. Dairy J.* 6: 285-294.
- Chang R L (1984). Process for the preparation of protein for hydrolysis. United States Patent 4482574.
- Chataud J, Desreumaux S y Cartwright T (1988 a). Procédé de préparation d'un mélange peptidique riche en di-tripeptides utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique, mélange ainsi obtenu, et utilisation de ce mélange en nutrition artificielle et en diététique. *Demanda de Brevet Europeen A20274939*.
- Chataud J, Desreumaux S y Cartwright T (1988 b). Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzimático de proteínas rico en di-et-tri-peptidos, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. *Demanda de Brevet Europeen A10274946*.
- Cheryan M, van Wik P J, Olson N F y Richardson T (1975). Continuous coagulation of milk using immobilized enzymes in fluidized-bed reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 585-598.
- Cheryan M y Deeslie W D (1980). Production of protein hydrolyzates in UF-enzyme reactors. *Ultrafiltration Membranes and Applications* (Cooper A R, ed.). Plenum Press, Nueva York: 591-601.
- Cheryan M (1986). *Ultrafiltration handbook*. Technomic Publishing Company, Lancaster.
- Cheryan M y Mehaia M A (1986). Membrane bioreactors. *Membrane Separations in Biotechnology* (McGregor C W, ed.). Marcel Dekker, Nueva York: 255-301.

- Chiang J P, Mingworth-Asmus B L y Sternberg M M (1982). Method for the preparation of a protein hydrolyzate from whey protein. European Patent Application A10065663.
- Chiang W D, Cordle C T y Thomas R L (1995). Casein hydrolysate produced using a formed-in-place membrane reactor. *J. Food Sci.* 60(6): 1349-1352.
- Chiba H y Yoshikawa M (1986). Biologically functional peptides from food proteins: new opioid peptides from milk proteins. *Protein Tailoring for Food and Medical Uses* (Feeney R E y Whitaker J R, eds.). Marcel Dekker, Nueva York.
- Chobert J M, Zitohy M Z y Whitaker J R (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. *J. Agric. Food Chem.* 36: 220-231.
- Chobert J M, Dalgalarondo M, Dufour E, Bertrand C, Haertle T (1991). Influence of pH on the structural changes of β -lactoglobulin studied by tryptic hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1077: 31-34.
- Constantinides A y Adu-Amankwa B (1980). Enzymatic modification of vegetable protein: mechanism, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 1543-1565.
- Cordle C T, Lin S B, Nelles L P, Thomas R L (1998). Debittered protein product having improved antigenicity and method for manufacture. United States Patent 5837312 (para Abbott Laboratories).
- Deeslie W D (1980). Enzymatic modification of soy proteins in a ultrafiltration-enzyme reactor system. Tesis Doctoral. University of Illinois at Urbana-Champaign.
- Deeslie W D y Cheryan M (1981 a). A CSTR-hollow fiber system for continuous hydrolysis of proteins. Performance and kinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 2257-2271.
- Deeslie W D y Cheryan M (1981 b). Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. *J. Food. Sci.* 46(4): 1035-1042.
- Deeslie W D y Cheryan M (1982). A CSTR-hollow fiber system for continuous hydrolysis of proteins. Factors affecting long term stability of the reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 69-82.

- Deeslie W D y Cheryan M (1988). Functional properties of soy protein hydrolysates from a continuous ultrafiltration reactor. *J. Agric. Food Chem.* 36: 26-31.
- De Rham O (1989). Procédé de preparation d'un produit lactosérique à allergénicité réduite. Demande de Brevet Europeen A10311795.
- Faigh J G, Stuart M J y Talbott L L (1989). Enzymatic hydrolysis of proteins. European Patent Application A20325986.
- Fukudome S y Yoshikawa M (1992). Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Lett.* 296: 107-120.
- González-Tello P, Camacho F, Jurado E, Páez M P y Guadix E M (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 523-528.
- Graf L, Horvath K, Walcz E, Berzetei I y Burnier J (1987). Effect of two synthetic gliadin peptides on lymphocytes in coeliac disease: Identificatioin of a novel class of opioid receptors. *Neuropeptides* 9: 113-120.
- Grimble G K y Silk D B A (1989). Peptides in human nutrition. *Nutr. Res. Rev.* 2:87-108.
- Groninger H S (1973). Preparation and properties of succinylated fish myofibrillar protein. *J. Agric. Food Chem.* 21: 978-981.
- Guadix E M (1993). Hidrólisis enzimática de las proteínas del suero láctico. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Ediciones Ayala, Madrid.
- Guillou H, Miranda G y Pelissier J P (1991). Hydrolysis of κ -casein by gastric proteases. *Int. J. Pept. Protein Res.* 37: 494-501.
- Halling P J (1981). Protein-stabilized foams and emulsions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15: 155-170.
- Haque Z U y Mozaffar Z (1992). Casein hydrolysate. I. Continuous production using enzyme bioreactors. *Food Hydrocolloids.* 5: 549-557.
- Haque Z U y Antila P (1993) Milk peptides: effect on the enzymatic hydrolysis of sodium caseinate. *Agric. Food Sci. Finl.* 2: 371-378.
- Henschen A, Lottspeich F, Brantl V y Teschmacher H (1979). Novel opioid peptides derived from casein (κ -casomorphins). II. Structure of active components from bovine casein peptone. *Physiol. Chem.* 360: 1217-1228.

- Herbert A B y Dunnill P (1989). Limited modifications of soya proteins by immobilized subtilisin: comparison of products from different reactor types. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 475-481.
- Horn J D (1980). Egg protein. *Applied protein chemistry* (Grant R A, ed.). Elsevier Applied Science Publishers, London: 69-86.
- Jeantet R, Rodriguez J y Garem A (2000). Nanofiltration of sweet whey by spiral wound organic membranes. *Lait* 80: 155-163.
- Jost R y Monti J C (1977). Whey protein hydrolysis by trypsin. *J. Dairy Sci.* 60(9): 1387-1393.
- Jost R, Meister N y Monti J C (1989). Procédé de préparation d'un hydrolysate de protéines de lactosérum et d'un aliment hypoallergéniques. Demande de Brevet Europeen A10321603 (para Nestlé S.A., Suiza).
- Kaneko T, Kojima T, Kuwata T y Yamamoto Y (1994) Selective enzymatic degradation of -lactoglobulin contained in cow's milk-serum protein. United States Patent 5322773 (para Meiji Milk Products Co., Japón).
- Kim S Y, Park P S W y Rhee K C (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified of soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 38: 651-659.
- Klaus R L y van Ness H C (1967). An extension of the spline fit technique and applications to thermodynamic data. *AIChE J.* 13(6): 1132-1136.
- Knights R J (1985). Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. *Nutrition for station needs in infance protein hydrolysates* (Lisshlpz F, ed.): 105-115.
- Krause J P y Schwenke K D (1995). Changes in interfacial properties of legumin from faba beans by triptic hydrolysis. *Nahrung* 39: 396-408.
- Kwong S y Vadehra D (1994). Protein hydrolysis. European Patent Specification 0406598B1 (para Nestlé S.A., Suiza).
- Lasch J, Koelsch R y Kretschmer K (1987). Continuous production of protein hydrolyzates in immobilized enzyme reactors. *Acta Biotechnol.* 7(3): 227-235.

- Leaver J y Dalglish D G (1990). The topography of bovine κ -casein at an oil/water interface as determined from the kinetics of trypsin-catalysed hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1041: 217-222.
- Lebenthal E, Lee P C y Heitinger L A (1983). Impact of development of the gastrointestinal tract on infant feeding. *J. Pediatr.* 102: 1-9.
- Lieske B y Konrad G (1996). Interrelation between pH and availability of α -lactalbumin and β -lactoglobulin for proteolysis by papain. *Int. Dairy J.* 6: 359-370.
- Lin C F y Lee C R (1983). Process for the preparation of protein for hydrolysis. European Patent Application 0087245 (para Stauffer Chemical Company, Estados Unidos).
- Loukas S, Varoucha D, Zioudrou C, Streaty A. y Klee W A (1983). Opioid activities and structures of α -casein derived exorphins. *Biochemistry* 22: 4567-4573.
- Mackie I M (1982). Fish protein hydrolysates. *Process Biochem.* 31: 26-28.
- Madsen J S y Qvist K B (1997). Hydrolysis of milk protein by a *Bacillus licheniformis* protease specific for acidic amino acid residues. *J. Food Sci.* 62(3): 579-582.
- Mahmoud M I, Malone W T y Cordle C T (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.* 57: 1223-1229.
- Mannheim A y Cheryan M (1990). Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *J. Food Sci.* 55(2): 381-390.
- Mannheim A y Cheryan M (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69: 1163-1176.
- Margot A, Flaschel E y Renken A (1994). Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis. Correlation of base consumption with soluble nitrogen content. *Process Biochem.* 29: 257-262.
- Margot A, Flaschel E y Renken A (1997). Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochem.* 32(3): 217-223.
- Markovic I, Topolovec V, Maric V y Johanides V (1988). The barley protein degradation: Mechanism of protein solubilization during barley mashing with neutral proteinase. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 18-27.

- Maubois J L, Roger L, Brule G y Piot M (1981). Hydrolysats enzymatique total de proteines de lactoserum, obtention et applications. Demande de Brevet Europeen A10022019.
- Maubois J L (1988). Proceedings of the Eighth International Biotechnology Symposium in Paris, Elsevier Applied Science Publishers, Amsterdam.
- Mehaia M A y Cheryan M (1983). Distribution of glyco- -casein in bovine casein micelles: a study using soluble and immobilized proteases. *J. Dairy Sci.* 66: 2474-2481.
- Melachouris N, Lee C R y Lin C F (1983). Process for the preparation of protein hydrolysates. European Patent Application 0087247 (para Stauffer Chemical Company, Estados Unidos).
- Mendy F, Kahn J M y Roger L (1996). Whey protein hydrolysates and mixtures thereof with casein and/or soy protein hydrolysates. United States Patent 5780439 (para Norvatis Nutrition AG, Estados Unidos).
- Mietsch F, Feher F y Halasz A (1989). Investigation of functional properties of partially hydrolyzed proteins. *Nahrung* 33(1): 9-15.
- Mohri M y Matsuchita S (1984). Improvement of water absorption of soybean protein by treatment with bromelain. *J. Agric. Food Chem.* 32: 486-492.
- Mukataka S, Haynes C A, Prausnitz J M y Blanch H W (1992). Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems: enzymatic hydrolysis of casein proteins. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 195-206.
- Nakamura T, Sado H y Syukunobe Y (1993). Production of low antigenic whey protein hydrolysates by denaturation with high pressure enzymatic hydrolysis. *Milchwissenschaft.* 48(3): 141-144.
- Ney K H (1979). Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length. *ACS Symp. Ser.* 115: 149-173.
- Nielsen P M y Hvass P (1993). Whey protein hydrolyzate. PTC International Application WO9324020.
- Nielsen P M, Eriksen S y Hansen O R (1997). Method for production of a whey protein hydrolyzate. United States Patent 5691165 (para Novo Nordisk A/S, Dinamarca).

- Otagiri K, Miyake I, Ishibashi N, Fukui H, Kanehisa H y Okai H (1983). Studies of bitter peptides from casein hydrolyzate. II. Syntheses of bitter peptide fragments (Arg-Gly-Pro-Pro-Phe-Ile-Val) from casein hydrolyzate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56(4): 1116-1119.
- Otani H, Dong X Y y Hosono A (1990). Preparation of low-immunogenic peptide fragments from milk casein. *Milchwissenschaft* 45(4): 217-220.
- Otlewski J y Zbyryt T (1994). Single peptide bond hydrolysis/resynthesis in squash inhibitors of serine proteinases. 1. Kinetics and thermodynamics of the interaction between squash inhibitors and bovine trypsin. *Biochemistry* 33 (1): 200-207.
- Pahud J J, Monti J C y Jost R (1985). Allergenicity of whey proteins: its modification by tryptic in vitro hydrolysis of the protein. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4: 408.
- Parker D M y Pawlett D (1987). Flavour control of protein hydrolysates. European Patent Application A20223560.
- Perea A y Ugalde U (1996). Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane reactor. *Enzyme Microb. Technol.* 18: 29-34.
- Petersen B R (1981). The impact of the enzymic hydrolysis process on recovery and use of proteins. *Enzymes and food processing* (Birch G G, Blakebrough N, Parker K J, eds.). Elsevier Applied Science Publishers, London: 149-175.
- Phillips R D y Beuchat L R (1981). Enzyme modification of proteins. *Protein Functionality in Foods* (Cherry J P, ed.). American Chemical Society, Washington.
- Pintado M E, Pintado A E y Malcata F X (1999). Controlled whey protein hydrolysis using 2 alternative proteases. *J. Food Eng.* 42(1): 1-13.
- Piske H (1991). Improved protein hydrolyzate for use in patients with defective protein digestion. German Patent DD 294 852.
- Ponnampalam R, Goulet G, Amiot J y Brisson G J (1987). Some functional and nutritional properties of oat flours as affected by proteolysis. *J. Agric. Food Chem.* 32: 279-288.
- Postolache C y Oncescu T (1989). Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalyzed by Alcalase. *Rev. Roum. Chim.* 34(2): 581-584.
- Prendergast K (1974). Protein hydrolyzates – a review. *Food Trade Rev.* 44(1): 14-21.

- Reimerdes E H (1978). Model proteolysis of α -casein with immobilized trypsin and its technological significance. *Enzyme Engineering* vol.4 (Broun G B, Manecke G y Wingard L B, eds.). Plenum Press, Nueva York: 275-276.
- Richter W V, Jacob B y Schwandt P (1983). Molecular weight determination of peptides by high performance gel chromatography. *Anal. Biochem.* 133: 288-291.
- Rupley J A (1967). Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. *Methods Enzymol.* 11: 905-917.
- Samuelsson E G y Poulsen O M (1987). A peptide preparation, a process for producing it and use of the peptide preparation. European Patent Application A10226221.
- Sanogo T, Paquet D, Aubert F y Linden G (1990). Proteolysis of α 1-casein by papain in a complex environment. Influence of ionic strength on the reaction products. *J. Food Sci.* 55(3): 796-800.
- Sarkki M L (1979). Food uses of wheat gluten. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56: 443-446.
- Scharf U, Schlingmann M y von Rymon G W (1986). Functional protein hydrolyzates, a process for their preparation, use of these protein hydrolyzates as a food additive, and foods containing these protein hydrolyzated. United States Patent 4627983 (para Hoechst, Alemania).
- Schlimme E, Meisel H y Frister H (1989). Bioactive sequences in milk proteins. *Milk proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects* (Barth C A y Schlimme E, eds.). Springer-Verlag, New York.
- Schlimme E y Meisel H (1995). Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung* 39: 1-12.
- Schmidt D G y Poll J K (1991). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Hydrolysis of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in buffer solutions by proteolytic enzymes. *Neth. Milk Dairy J.* 45: 225-240.
- Schmidt D G y van Markwijk B W (1993). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. Influence of heat treatment of α -lactalbumin and β -lactoglobulin on their proteolysis by pepsin and papain. *Neth. Milk Dairy J.* 47: 15-22.

- Schwenke K D, Staatz A, Dudek S, Krause J P y Noack J (1995). Legumin-T from faba beans: isolation, partial characterization and surface functional properties. *Nahrung* 39: 193-205.
- Smith D M y Brekke C J (1984). Functional properties of enzymatically modified beef heart protein. *J. Food Sci.* 49: 1525-1528.
- Snyder S L y Sobocinsky P Z (1975). An improved trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal. Biochem.* 64: 284-288.
- Spinelli J, Groninger H, Koury B y Miller R (1975). Functional protein isolates and derivatives from fish muscle. *Process Biochem.* 42: 31-36.
- Steinhardt J y Beychock S (1964). Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules. *Proteins II*: 139-304.
- Svendsen I (1976). Chemical modifications of subtilisins with special preference to the binding of large substrates. A review. *Carlsberg Res. Commun.* 41: 237-291.
- Sweigart R D (1978). Industrial applications of immobilized enzymes: state of the art. *Enzyme Engineering vol.4* (Broun G B, Manecke G y Wingard L B, eds.). Plenum Press, Nueva York: 229-236.
- Tao T M y Watson A T (1988). An adaptive algorithm for fitting with splines. *AIChE J.* 34(10): 1722-1725.
- Tayyab S y Qamar S (1992). A look into Enzyme Kinetics: Some Introductory Experiments. *Biochem. Educ.* 20(2): 116-118.
- Tomita M, Kitazawa T, Kawaura S, Fukuwatari Y y Nojiri M (1994). Milk-protein hydrolyzates and compositions for use as hair and skin treating agent. United States Patent 5314873 (para Morinaga Milk Industry Co, Japón).
- Tossavainen O, Heikonem M y Linko P (1983) Milk protein hydrolysates. *Kem.-Kemi* 10: 963-964.
- Tschimirov J I, Schwenke K D, Augustat D y Tolstoguzov V B (1983). Functional properties of plant proteins. Part V. Influence of partial enzymatic hydrolysis on selected functional properties of wheat gluten. *Nahrung* 27: 659-670.

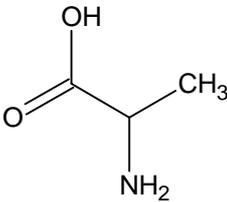
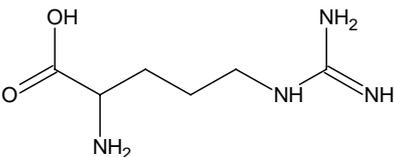
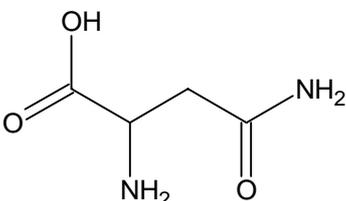
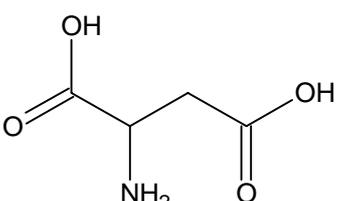
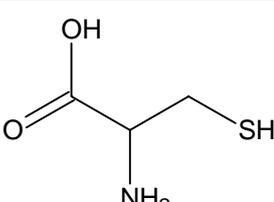
9. APÉNDICE

- Tsugita A, Hansu U M y Ataka T (1986). Hydrolysis of protein. Japanese Patent 61151157A2 (para Seiko Ltd., Japón)
- Voet D y Voet J G (1990). Bioquímica. Ediciones Omega, Barcelona.
- Vorob'ev M M, Levicheva I Y y Belikov V M (1996). Kinetics of the initial stage of milk protein hydrolysis by chymotrypsin. *Appl. Biochem. Microbiol.* 32(2): 219-222.
- Weber B A y Nielsen S S (1991). Isolation and partial characterization of a native serine-type protease inhibitor from bovine milk. *J. Dairy Sci.* 74: 764-771.
- Zakaria F y McFeeters R F (1978). Improvement of the emulsifying properties of soy protein by limited pepsin hydrolysis. *Lebensm.- Biotechnol.* 11: 42-52.

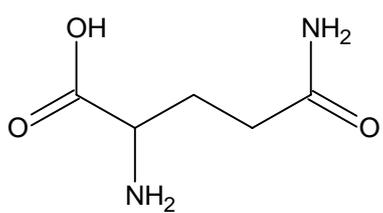
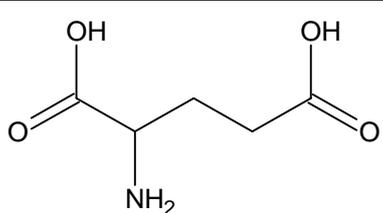
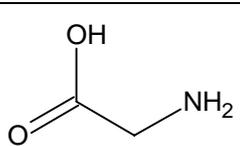
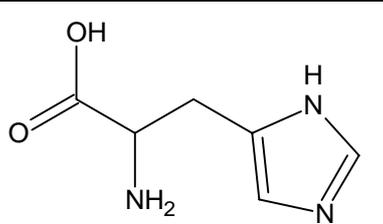
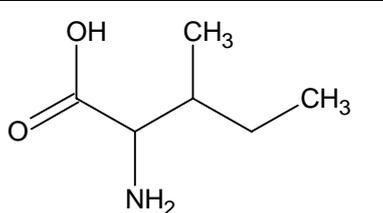
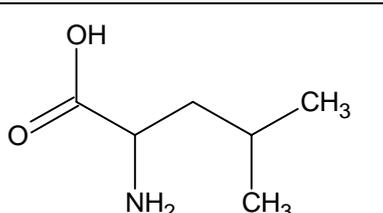
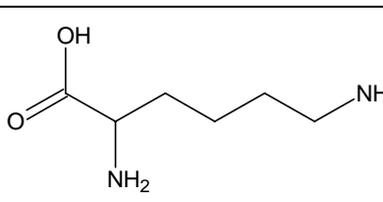
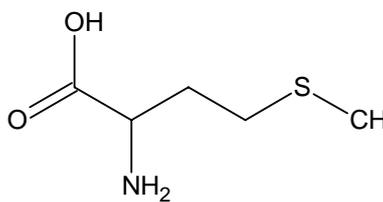
9. APÉNDICES

Apéndice 9.1.

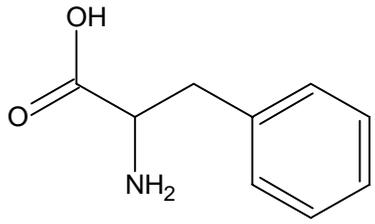
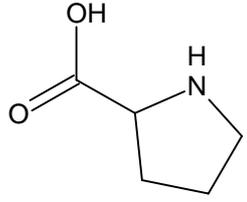
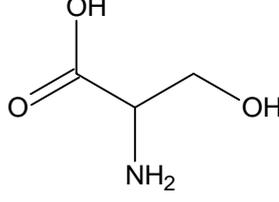
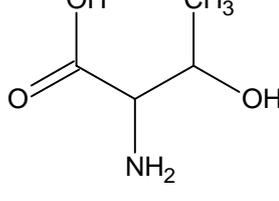
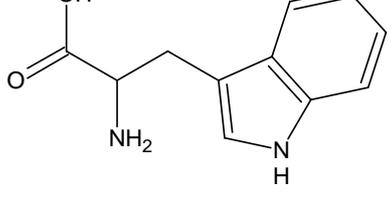
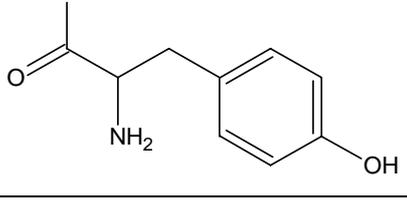
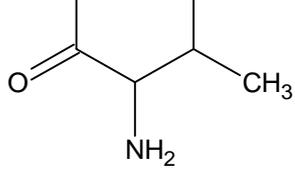
Tabla A- 1. Aminoácidos encontrados en las proteínas.

Aminoácido		Símbolo Tres/Una letra	Peso molecular	Nombre químico	Estructura
Nombre					
Alanina	Ala	A	89.1	ácido α -aminopropiónico	
Arginina	Arg	R	174.2	ácido α -amino- δ -ureinovaleriánico	
Asparagina	Asn	N	132.1	amida del ácido aspártico	
Acido aspártico	Asp	D	133.1	ácido α -aminosuccínico	
Cisteína	Cys	C	121.1	ácido α -amino- β -mercaptopropiónico	

9. APÉNDICE

Glutamina	Gln	Q	146.1	amida de ácido glutámico	
Acido glutámico	Glu	E	147.1	ácido α -aminoglutámico	
Glicina	Gly	G	75.1	ácido α -aminoacético	
Histidina	His	H	155.2	ácido α -amino- β -imidazol-propiónico	
Isoleucina	Ile	I	131.2	ácido α -amino- β -metilvaleriánico	
Leucina	Leu	L	131.2	ácido α -aminoisocaproico	
Lisina	Lys	K	146.2	ácido α - ϵ -diaminocapropico	
Metionina	Met	M	149.2	ácido α -amino- δ -metiltiol-n-butírico	

9. APÉNDICE

Fenilalanina	Phe	F	165.2	ácido α -amino- β -fenilpropiónico	
Prolina	Pro	P	115.1	ácido pirrolidín-2-carboxílico	
Serina	Ser	S	105.1	ácido α -amino- β -hidroxipropiónico	
Treonina	Thr	T	119.1	ácido α -amino- β -hidroxin-butírico	
Triptófano	Trp	W	204.2	ácido α -amino- β -3-indolilpropiónico	
Tirosina	Tyr	Y	181.2	ácido α -amino- β -(<i>p</i> -hidroxifenilpropiónico)	
Valina	Val	V	117.1	ácido aminoisovaleriánico	

Apéndice 9.2.

Selección de la enzima: hidrólisis discontinua de proteínas del lactosuero con diferentes enzimas comerciales. Consumo de base para mantener el pH constante y grado de hidrólisis aparente.

Tabla A- 2 Enzima: Alcalasa 0.6 L, $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $pH = 8.5$, $T = 50$ °C, $NB = 1.957$ N

t (min)	V (mL)	x_{ap}	t (min)	V (mL)	x_{ap}
0	0.000	0.0000	125	32.674	0.0727
5	3.514	0.0078	130	33.360	0.0742
10	5.880	0.0131	135	34.036	0.0757
15	7.940	0.0177	140	34.678	0.0771
20	9.734	0.0216	145	35.276	0.0784
25	11.396	0.0253	150	35.852	0.0797
30	12.948	0.0288	155	36.426	0.0810
35	14.434	0.0321	160	36.996	0.0823
40	15.814	0.0352	165	37.556	0.0835
45	17.188	0.0382	170	38.082	0.0847
50	18.444	0.0410	175	38.592	0.0858
55	19.692	0.0438	180	39.062	0.0869
60	20.924	0.0465	185	39.566	0.0880
65	22.046	0.0490	190	40.072	0.0891
70	23.108	0.0514	195	40.544	0.0902
75	24.180	0.0538	200	41.024	0.0912
80	25.210	0.0561	205	41.468	0.0922
85	26.184	0.0582	210	41.930	0.0932
90	27.114	0.0603	215	42.396	0.0943
95	27.974	0.0622	220	42.786	0.0952
100	28.816	0.0641	225	43.120	0.0959
105	29.646	0.0659	230	43.490	0.0967

9. APÉNDICE

110	30.510	0.0679		235	43.854	0.0975
115	31.228	0.0694		240	44.242	0.0984
120	32.006	0.0712				

Tabla A- 3. Enzima: Multifect P3000, $s_0 = 50$ g/L, E/S = 0.01, pH = 8.5, T = 50 °C, $N_B = 1.957$ N

t (min)	V (mL)	x _{ap}		t (min)	V (mL)	x _{ap}
0	0.000	0.000		125	48.058	0.107
5	7.384	0.016		130	48.718	0.108
10	12.200	0.027		135	49.336	0.110
15	16.252	0.036		140	49.966	0.111
20	19.326	0.043		145	50.570	0.112
25	21.914	0.049		150	51.146	0.114
30	24.438	0.054		155	51.712	0.115
35	26.824	0.060		160	52.214	0.116
40	28.830	0.064		165	52.692	0.117
45	30.632	0.068		170	53.182	0.118
50	32.360	0.072		175	53.670	0.119
55	33.854	0.075		180	54.138	0.120
60	35.342	0.079		185	54.568	0.121
65	36.744	0.082		190	54.992	0.122
70	38.032	0.085		195	55.424	0.123
75	39.222	0.087		200	55.820	0.124
80	40.300	0.090		205	56.234	0.125
85	41.376	0.092		210	56.666	0.126
90	42.362	0.094		215	57.066	0.127
95	43.264	0.096		220	57.454	0.128
100	44.230	0.098		225	57.808	0.129

9. APÉNDICE

105	45.008	0.100		230	58.172	0.129
110	45.858	0.102		235	58.526	0.130
115	46.638	0.104		240	58.886	0.131
120	47.358	0.105				

Tabla A- 4. Enzima: Protex 6L, $s_0 = 50$ g/L, $E/S = 0.01$, $pH = 8.5$, $T = 50$ °C, $N_B = 1.957$ N

<u>t (min)</u>	<u>V (mL)</u>	<u>x_{ap}</u>		<u>t (min)</u>	<u>V (mL)</u>	<u>x_{ap}</u>
0	0.000	0.000		125	58.644	0.130
5	13.190	0.029		130	59.216	0.132
10	20.014	0.045		135	59.748	0.133
15	26.180	0.058		140	60.304	0.134
20	30.870	0.069		145	60.820	0.135
25	34.534	0.077		150	61.350	0.136
30	37.518	0.083		155	61.840	0.138
35	39.764	0.088		160	62.356	0.139
40	41.834	0.093		165	62.842	0.140
45	43.676	0.097		170	63.290	0.141
50	45.182	0.100		175	63.730	0.142
55	46.614	0.104		180	64.158	0.143
60	47.860	0.106		185	64.584	0.144
65	49.104	0.109		190	64.962	0.144
70	50.164	0.112		195	65.388	0.145
75	51.184	0.114		200	65.774	0.146
80	52.098	0.116		205	66.200	0.147
85	53.020	0.118		210	66.600	0.148
90	53.862	0.120		215	67.012	0.149
95	54.660	0.122		220	67.412	0.150

9. APÉNDICE

100	55.436	0.123	225	67.872	0.151
105	56.108	0.125	230	68.300	0.152
110	56.796	0.126	235	68.750	0.153
115	57.402	0.128	240	69.160	0.154
120	58.018	0.129			

Tabla A- 5. Enzima: PEM 2500 S, $s_0 = 50$ g/L, E/S = 0.01, pH = 8.0, T = 50 °C, $N_B = 1.957$ N

t (min)	V (mL)	x_{ap}	t (min)	V (mL)	x_{ap}
0	0.002	0.000	125	45.270	0.101
5	20.008	0.044	130	45.572	0.101
10	26.792	0.060	135	45.882	0.102
15	29.788	0.066	140	46.170	0.103
20	31.982	0.071	145	46.464	0.103
25	33.694	0.075	150	46.716	0.104
30	35.050	0.078	155	46.948	0.104
35	36.166	0.080	160	47.186	0.105
40	37.124	0.083	165	47.414	0.105
45	37.984	0.084	170	47.674	0.106
50	38.736	0.086	175	47.934	0.107
55	39.388	0.088	180	48.190	0.107
60	39.988	0.089	185	48.414	0.108
65	40.526	0.090	190	48.662	0.108
70	41.034	0.091	195	48.894	0.109
75	41.522	0.092	200	49.090	0.109
80	41.984	0.093	205	49.316	0.110
85	42.380	0.094	210	49.520	0.110
90	42.762	0.095	215	49.688	0.110

9. APÉNDICE

95	43.148	0.096	220	49.868	0.111
100	43.566	0.097	225	50.068	0.111
105	43.918	0.098	230	50.284	0.112
110	44.264	0.098	235	50.496	0.112
115	44.580	0.099	240	50.700	0.113
120	44.920	0.100			

Apéndice 9.3.

Equivalentes de base consumidos en la valoración de la proteína del lactosuero nativa, b_s , y parcialmente hidrolizada, b_x , con Protex 6L a pH = 8.5 Y T = 50 °C.

Tabla A- 6. $s_0 = 10$ g/L, $V_0 = 203.076$ mL, $V_{BH} = 0.426$ mL, $N_{BH} = 1.9844$ N, $x_{ap} = 0.048$

pH	b_x (eq/L)	b_s (eq/L)	$b_x - b_s$ (eq/L)
6.492	0.000000	0.000000	0.000000
6.532	0.000137	0.000111	0.000026
6.561	0.000274	0.000164	0.000110
6.597	0.000391	0.000221	0.000170
6.643	0.000508	0.000288	0.000220
6.678	0.000645	0.000343	0.000302
6.709	0.000743	0.000391	0.000352
6.736	0.000879	0.000433	0.000446
6.773	0.000977	0.000523	0.000454
6.803	0.001094	0.000598	0.000496
6.841	0.001211	0.000680	0.000532
6.872	0.001329	0.000729	0.000600
6.913	0.001426	0.000791	0.000635
6.949	0.001544	0.000851	0.000693
6.976	0.001661	0.000893	0.000768
7.004	0.001759	0.000936	0.000822
7.035	0.001876	0.000981	0.000894
7.071	0.002012	0.001018	0.000994
7.107	0.002091	0.001053	0.001038
7.152	0.002188	0.001155	0.001033

9. APÉNDICE

7.170	0.002286	0.001182	0.001104
7.201	0.002384	0.001228	0.001156
7.232	0.002462	0.001258	0.001203
7.277	0.002579	0.001294	0.001285
7.300	0.002657	0.001310	0.001347
7.331	0.002755	0.001393	0.001361
7.356	0.002833	0.001422	0.001410
7.410	0.002911	0.001486	0.001424
7.435	0.002989	0.001524	0.001464
7.469	0.003086	0.001576	0.001510
7.499	0.003145	0.001624	0.001521
7.525	0.003223	0.001663	0.001560
7.566	0.003301	0.001719	0.001582
7.598	0.003379	0.001758	0.001621
7.642	0.003457	0.001795	0.001662
7.665	0.003515	0.001810	0.001706
7.693	0.003593	0.001830	0.001763
7.741	0.003671	0.001943	0.001728
7.774	0.003730	0.001961	0.001768
7.811	0.003788	0.001978	0.001810
7.834	0.003866	0.001989	0.001877
7.864	0.003924	0.002064	0.001860
7.876	0.003983	0.002075	0.001908
7.918	0.004041	0.002114	0.001927
7.938	0.004119	0.002130	0.001989

9. APÉNDICE

7.978	0.004177	0.002206	0.001972
8.007	0.004236	0.002254	0.001982
8.052	0.004294	0.002314	0.001979
8.066	0.004332	0.002333	0.002000
8.103	0.004410	0.002406	0.002004
8.122	0.004449	0.002447	0.002002
8.163	0.004526	0.002507	0.002020
8.198	0.004565	0.002531	0.002034
8.221	0.004623	0.002549	0.002074
8.251	0.004681	0.002629	0.002051
8.269	0.004739	0.002655	0.002084
8.308	0.004797	0.002709	0.002088
8.331	0.004835	0.002729	0.002106
8.356	0.004913	0.002750	0.002163
8.389	0.004951	0.002775	0.002176
8.415	0.005009	0.002823	0.002186
8.440	0.005047	0.002932	0.002115
8.461	0.005105	0.002993	0.002111
8.493	0.005162	0.003020	0.002142
8.519	0.005220	0.003034	0.002186
8.540	0.005258	0.003069	0.002189
8.548	0.005316	0.003090	0.002226
8.576	0.005373	0.003138	0.002235
8.593	0.005412	0.003165	0.002246
8.644	0.005448	0.003338	0.002110

9. APÉNDICE

8.664	0.005506	0.003374	0.002132
8.670	0.005564	0.003384	0.002180
8.695	0.005621	0.003424	0.002197
8.723	0.005658	0.003443	0.002215
8.743	0.005696	0.003448	0.002248
8.747	0.005754	0.003450	0.002305
8.784	0.005791	0.003652	0.002139
8.803	0.005848	0.003683	0.002165
8.828	0.005885	0.003717	0.002168
8.846	0.005922	0.003737	0.002186
8.861	0.005980	0.003753	0.002227
8.871	0.006037	0.003767	0.002270
8.900	0.006074	0.003826	0.002247
8.924	0.006130	0.003911	0.002219
8.943	0.006167	0.003935	0.002232
8.961	0.006204	0.003959	0.002245
8.976	0.006261	0.004016	0.002244
8.998	0.006297	0.004097	0.002200
9.007	0.006335	0.004117	0.002218
9.026	0.006391	0.004148	0.002243
9.042	0.006428	0.004158	0.002270
9.052	0.006485	0.004164	0.002321
9.081	0.006520	0.004208	0.002312
9.100	0.006615	0.004338	0.002276
9.113	0.006652	0.004376	0.002276

9. APÉNDICE

9.128	0.006708	0.004402	0.002306
9.134	0.006746	0.004411	0.002335
9.164	0.006799	0.004513	0.002286
9.165	0.006838	0.004516	0.002323
9.188	0.006873	0.004630	0.002243
9.195	0.006930	0.004674	0.002256
9.215	0.006965	0.004692	0.002273
9.231	0.007001	0.004699	0.002301
9.241	0.007057	0.004712	0.002345
9.256	0.007093	0.004753	0.002340
9.266	0.007130	0.004792	0.002338
9.292	0.007182	0.004917	0.002265
9.302	0.007258	0.004954	0.002304
9.315	0.007293	0.004975	0.002319
9.330	0.007329	0.005038	0.002290
9.341	0.007365	0.005088	0.002276
9.345	0.007403	0.005098	0.002304
9.359	0.007438	0.005136	0.002302
9.368	0.007474	0.005166	0.002308
9.387	0.007508	0.005244	0.002263
9.402	0.007542	0.005281	0.002261
9.417	0.007615	0.005321	0.002294
9.427	0.007651	0.005349	0.002302
9.430	0.007689	0.005357	0.002332

9. APÉNDICE

Tabla A- 7. $s_0 = 10$ g/L, $V_0 = 202.155$ mL, $V_{BH} = 0.853$ mL, $N_{BH} = 1.9844$ N, $x_{ap} = 0.09$

pH	b_x (eq/L)	b_s (eq/L)	$b_x - b_s$ (eq/L)
6.518	0.000000	0.000000	0.000000
6.539	0.000177	0.000124	0.000053
6.552	0.000393	0.000148	0.000245
6.597	0.000589	0.000221	0.000368
6.643	0.000805	0.000288	0.000517
6.669	0.000942	0.000329	0.000614
6.702	0.001119	0.000380	0.000739
6.735	0.001335	0.000432	0.000903
6.767	0.001512	0.000504	0.001008
6.796	0.001669	0.000584	0.001085
6.818	0.001904	0.000630	0.001274
6.867	0.002100	0.000721	0.001379
6.898	0.002218	0.000770	0.001448
6.911	0.002395	0.000789	0.001606
6.938	0.002650	0.000834	0.001816
6.981	0.002807	0.000901	0.001906
7.010	0.002944	0.000946	0.001999
7.042	0.003141	0.000989	0.002152
7.061	0.003337	0.001009	0.002328
7.091	0.003514	0.001038	0.002476
7.132	0.003631	0.001114	0.002518
7.162	0.003788	0.001170	0.002618
7.190	0.003945	0.001212	0.002733

9. APÉNDICE

7.223	0.004142	0.001251	0.002891
7.252	0.004259	0.001274	0.002985
7.284	0.004436	0.001299	0.003137
7.312	0.004593	0.001319	0.003275
7.335	0.004730	0.001398	0.003333
7.374	0.004848	0.001444	0.003404
7.389	0.005005	0.001461	0.003544
7.425	0.005162	0.001509	0.003653
7.460	0.005299	0.001562	0.003737
7.483	0.005437	0.001599	0.003838
7.526	0.005594	0.001664	0.003930
7.565	0.005711	0.001717	0.003994
7.592	0.005809	0.001752	0.004058
7.603	0.005947	0.001764	0.004182
7.639	0.006084	0.001793	0.004291
7.677	0.006241	0.001818	0.004423
7.720	0.006339	0.001902	0.004436
7.738	0.006456	0.001941	0.004515
7.773	0.006613	0.001961	0.004652
7.809	0.006711	0.001978	0.004733
7.829	0.006809	0.001987	0.004822
7.873	0.006926	0.002072	0.004854
7.903	0.007044	0.002100	0.004943
7.914	0.007181	0.002111	0.005071
7.969	0.007279	0.002192	0.005086

9. APÉNDICE

7.990	0.007357	0.002225	0.005132
8.026	0.007474	0.002278	0.005196
8.053	0.007592	0.002315	0.005276
8.094	0.007709	0.002384	0.005325
8.125	0.007807	0.002453	0.005354
8.165	0.007884	0.002508	0.005376
8.193	0.008002	0.002528	0.005474
8.201	0.008119	0.002533	0.005586
8.247	0.008236	0.002618	0.005618
8.273	0.008314	0.002661	0.005653
8.316	0.008411	0.002716	0.005695
8.342	0.008489	0.002739	0.005750
8.362	0.008606	0.002754	0.005852
8.393	0.008703	0.002777	0.005926
8.426	0.008800	0.002868	0.005933
8.466	0.008878	0.002999	0.005878
8.472	0.008976	0.003005	0.005970
8.524	0.009091	0.003037	0.006054
8.551	0.009169	0.003099	0.006069
8.571	0.009246	0.003130	0.006116
8.609	0.009362	0.003190	0.006172
8.649	0.009438	0.003347	0.006092
8.670	0.009555	0.003384	0.006171
8.677	0.009633	0.003396	0.006237
8.711	0.009710	0.003439	0.006271

9. APÉNDICE

8.756	0.009824	0.003456	0.006368
8.774	0.009901	0.003629	0.006273
8.805	0.009997	0.003686	0.006312
8.823	0.010074	0.003710	0.006364
8.854	0.010189	0.003745	0.006444
8.866	0.010267	0.003758	0.006508
8.891	0.010363	0.003801	0.006561
8.924	0.010438	0.003911	0.006527
8.953	0.010552	0.003948	0.006605
8.981	0.010647	0.004045	0.006602
9.014	0.010721	0.004131	0.006590
9.042	0.010816	0.004158	0.006658
9.052	0.010913	0.004164	0.006749
9.080	0.011026	0.004202	0.006824
9.120	0.011098	0.004389	0.006709
9.121	0.011177	0.004391	0.006786
9.148	0.011290	0.004467	0.006823
9.181	0.011362	0.004569	0.006793
9.187	0.011440	0.004621	0.006819
9.212	0.011533	0.004690	0.006842
9.243	0.011624	0.004715	0.006909
9.258	0.011837	0.004762	0.007075
9.296	0.011926	0.004933	0.006993
9.319	0.011998	0.004984	0.007015
9.344	0.012070	0.005096	0.006974

9. APÉNDICE

9.352	0.012186	0.005114	0.007072
9.372	0.012337	0.005181	0.007156
9.398	0.012388	0.005271	0.007117
9.421	0.012478	0.005332	0.007147

Tabla A- 8. $s_0 = 10$ g/L, $V_0 = 203.477$ mL, $V_{BH} = 1.705$ mL, $N_{BH} = 1.9844$ N, $x_{ap} = 0.192$

pH	b_x (eq/L)	b_s (eq/L)	$b_x - b_s$ (eq/L)
6.493	0.000000	0.000000	0.000000
6.508	0.000117	0.000061	0.000056
6.526	0.000254	0.000099	0.000155
6.538	0.000371	0.000122	0.000248
6.548	0.000507	0.000141	0.000366
6.556	0.000663	0.000155	0.000508
6.571	0.000761	0.000182	0.000579
6.579	0.000897	0.000195	0.000703
6.610	0.001014	0.000238	0.000776
6.623	0.001112	0.000257	0.000855
6.632	0.001268	0.000271	0.000997
6.653	0.001404	0.000304	0.001101
6.689	0.001658	0.000360	0.001298
6.712	0.001853	0.000396	0.001457
6.752	0.002223	0.000458	0.001765
6.758	0.002321	0.000476	0.001845
6.772	0.002555	0.000519	0.002036
6.791	0.002672	0.000573	0.002099

9. APÉNDICE

6.798	0.002809	0.000588	0.002221
6.823	0.002945	0.000641	0.002304
6.846	0.003160	0.000687	0.002472
6.857	0.003257	0.000705	0.002552
6.869	0.003394	0.000724	0.002669
6.885	0.003491	0.000750	0.002741
6.897	0.003745	0.000768	0.002976
6.926	0.003862	0.000813	0.003048
6.938	0.003979	0.000834	0.003145
6.949	0.004115	0.000851	0.003265
6.959	0.004252	0.000867	0.003385
6.982	0.004388	0.000902	0.003486
6.995	0.004505	0.000922	0.003583
7.002	0.004642	0.000933	0.003709
7.017	0.004739	0.000956	0.003783
7.043	0.005012	0.000990	0.004022
7.065	0.005285	0.001013	0.004273
7.089	0.005422	0.001036	0.004386
7.101	0.005636	0.001047	0.004589
7.127	0.005773	0.001099	0.004674
7.150	0.005968	0.001153	0.004815
7.160	0.006104	0.001167	0.004937
7.178	0.006241	0.001194	0.005047
7.185	0.006377	0.001205	0.005173
7.206	0.006494	0.001235	0.005260

9. APÉNDICE

7.211	0.006592	0.001241	0.005351
7.219	0.006728	0.001247	0.005481
7.247	0.006826	0.001271	0.005555
7.252	0.006923	0.001274	0.005649
7.269	0.007177	0.001288	0.005889
7.303	0.007294	0.001312	0.005982
7.310	0.007372	0.001317	0.006055
7.320	0.007489	0.001382	0.006107
7.331	0.007606	0.001393	0.006213
7.346	0.007703	0.001410	0.006293
7.364	0.007801	0.001432	0.006369
7.376	0.007918	0.001446	0.006471
7.400	0.008054	0.001473	0.006582
7.407	0.008152	0.001480	0.006671
7.423	0.008269	0.001507	0.006762
7.442	0.008386	0.001538	0.006848
7.453	0.008483	0.001552	0.006931
7.460	0.008620	0.001562	0.007057
7.481	0.008737	0.001595	0.007141
7.498	0.008815	0.001622	0.007193
7.501	0.008912	0.001627	0.007286
7.511	0.009049	0.001641	0.007408
7.549	0.009166	0.001697	0.007469
7.560	0.009341	0.001711	0.007630
7.585	0.009458	0.001743	0.007715

9. APÉNDICE

7.595	0.009555	0.001755	0.007800
7.621	0.009653	0.001782	0.007871
7.637	0.009789	0.001792	0.007997
7.646	0.009887	0.001798	0.008089
7.675	0.010004	0.001816	0.008187
7.693	0.010199	0.001830	0.008368
7.715	0.010296	0.001885	0.008411
7.726	0.010393	0.001922	0.008471
7.754	0.010471	0.001951	0.008520
7.767	0.010569	0.001958	0.008611
7.769	0.010686	0.001959	0.008727
7.802	0.010783	0.001974	0.008808
7.820	0.010861	0.001983	0.008878
7.825	0.010978	0.001985	0.008993
7.845	0.011075	0.001994	0.009081
7.855	0.011153	0.002057	0.009096
7.876	0.011231	0.002075	0.009156
7.896	0.011328	0.002094	0.009234
7.922	0.011445	0.002118	0.009327
7.952	0.011601	0.002162	0.009439
7.963	0.011659	0.002184	0.009475
7.985	0.011756	0.002217	0.009540
8.001	0.011854	0.002243	0.009610
8.011	0.011912	0.002258	0.009654
8.031	0.012029	0.002285	0.009744

9. APÉNDICE

8.049	0.012126	0.002310	0.009816
8.082	0.012184	0.002352	0.009833
8.095	0.012262	0.002386	0.009876
8.121	0.012339	0.002444	0.009895
8.128	0.012417	0.002459	0.009958
8.149	0.012495	0.002496	0.009999
8.172	0.012573	0.002513	0.010059
8.182	0.012650	0.002520	0.010130
8.199	0.012728	0.002532	0.010196
8.233	0.012805	0.002579	0.010227
8.250	0.012961	0.002627	0.010335
8.274	0.013019	0.002663	0.010356
8.293	0.013097	0.002690	0.010407
8.317	0.013194	0.002717	0.010476
8.329	0.013271	0.002728	0.010543
8.362	0.013329	0.002754	0.010575
8.373	0.013407	0.002762	0.010645
8.405	0.013484	0.002793	0.010691
8.409	0.013561	0.002805	0.010756
8.442	0.013619	0.002941	0.010678
8.456	0.013716	0.002986	0.010729
8.480	0.013773	0.003012	0.010761
8.510	0.013811	0.003029	0.010783
8.516	0.013811	0.003032	0.010779
8.523	0.013811	0.003036	0.010775

9. APÉNDICE

8.536	0.013810	0.003058	0.010752
8.548	0.014141	0.003090	0.011051
8.581	0.014237	0.003146	0.011091
8.599	0.014334	0.003174	0.011160
8.642	0.014429	0.003335	0.011094
8.655	0.014526	0.003357	0.011169
8.693	0.014602	0.003421	0.011180
8.707	0.014698	0.003436	0.011262
8.750	0.014793	0.003451	0.011342
8.778	0.014869	0.003639	0.011230
8.790	0.014946	0.003663	0.011283
8.824	0.015060	0.003712	0.011348
8.846	0.015136	0.003737	0.011400
8.882	0.015211	0.003785	0.011426
8.902	0.015306	0.003838	0.011469
8.933	0.015401	0.003922	0.011479
8.963	0.015495	0.003962	0.011533
8.987	0.015570	0.004071	0.011499
9.015	0.015664	0.004133	0.011531
9.028	0.015740	0.004149	0.011591
9.068	0.015832	0.004178	0.011654
9.088	0.015907	0.004255	0.011652
9.096	0.015984	0.004313	0.011671
9.139	0.016074	0.004419	0.011655
9.152	0.016169	0.004485	0.011684

9. APÉNDICE

9.191	0.016279	0.004654	0.011625
9.211	0.016333	0.004690	0.011643
9.233	0.016426	0.004701	0.011725
9.246	0.016540	0.004720	0.011820
9.270	0.016632	0.004810	0.011823
9.305	0.016702	0.004965	0.011737
9.321	0.016776	0.004991	0.011784
9.348	0.016846	0.005105	0.011742
9.359	0.016960	0.005136	0.011824
9.382	0.017090	0.005222	0.011867
9.412	0.017139	0.005307	0.011831
9.433	0.017229	0.005366	0.011863

Tabla A- 9. $s_0 = 10 \text{ g/L}$, $V_0 = 203.396 \text{ mL}$, $V_{BH} = 2.376 \text{ mL}$, $N_{BH} = 1.9844 \text{ N}$, $x_{ap} = 0.268$

pH	$b_x \text{ (eq/L)}$	$b_s \text{ (eq/L)}$	$b_x - b_s \text{ (eq/L)}$
6.508	0.000000	0.000000	0.000000
6.536	0.000330	0.000118	0.000212
6.566	0.000641	0.000173	0.000468
6.589	0.000951	0.000209	0.000742
6.617	0.001223	0.000248	0.000975
6.638	0.001534	0.000280	0.001254
6.670	0.001845	0.000330	0.001514
6.703	0.002155	0.000382	0.001774
6.724	0.002369	0.000414	0.001954
6.745	0.002660	0.000447	0.002213

9. APÉNDICE

6.767	0.002932	0.000504	0.002428
6.791	0.003243	0.000573	0.002669
6.818	0.003534	0.000630	0.002904
6.839	0.003825	0.000675	0.003150
6.865	0.004116	0.000718	0.003399
6.885	0.004369	0.000750	0.003619
6.912	0.004640	0.000790	0.003850
6.935	0.004932	0.000829	0.004103
6.956	0.005223	0.000862	0.004361
6.986	0.005514	0.000908	0.004606
7.007	0.005786	0.000941	0.004845
7.027	0.006077	0.000971	0.005106
7.048	0.006349	0.000995	0.005354
7.069	0.006621	0.001016	0.005604
7.091	0.006893	0.001038	0.005855
7.120	0.007164	0.001079	0.006085
7.144	0.007436	0.001144	0.006292
7.171	0.007708	0.001184	0.006524
7.190	0.007980	0.001212	0.006768
7.208	0.008252	0.001237	0.007014
7.239	0.008523	0.001264	0.007259
7.262	0.008756	0.001282	0.007474
7.285	0.009009	0.001300	0.007709
7.305	0.009261	0.001314	0.007947
7.331	0.009455	0.001393	0.008062

9. APÉNDICE

7.352	0.009708	0.001417	0.008290
7.379	0.009940	0.001450	0.008491
7.400	0.010154	0.001473	0.008681
7.420	0.010406	0.001503	0.008904
7.453	0.010639	0.001552	0.009087
7.474	0.010892	0.001584	0.009307
7.501	0.011105	0.001627	0.009479
7.527	0.011338	0.001666	0.009672
7.550	0.011532	0.001698	0.009834
7.573	0.011784	0.001728	0.010056
7.602	0.011978	0.001763	0.010215
7.624	0.012172	0.001784	0.010389
7.653	0.012425	0.001802	0.010623
7.680	0.012599	0.001820	0.010779
7.703	0.012774	0.001845	0.010929
7.728	0.013007	0.001928	0.011079
7.764	0.013162	0.001956	0.011206
7.782	0.013317	0.001965	0.011352
7.802	0.013550	0.001974	0.011575
7.836	0.013724	0.001990	0.011734
7.857	0.013880	0.002059	0.011821
7.882	0.014073	0.002081	0.011993
7.910	0.014229	0.002107	0.012122
7.941	0.014403	0.002132	0.012270
7.968	0.014539	0.002191	0.012348

9. APÉNDICE

7.989	0.014694	0.002223	0.012470
8.022	0.014887	0.002273	0.012615
8.050	0.015003	0.002311	0.012692
8.068	0.015178	0.002335	0.012843
8.104	0.015352	0.002409	0.012943
8.139	0.015449	0.002482	0.012966
8.162	0.015584	0.002506	0.013078
8.190	0.015739	0.002526	0.013213
8.214	0.015855	0.002543	0.013312
8.244	0.016010	0.002610	0.013400
8.270	0.016145	0.002657	0.013488
8.307	0.016261	0.002708	0.013553
8.325	0.016377	0.002724	0.013652
8.363	0.016511	0.002755	0.013757
8.386	0.016627	0.002773	0.013854
8.412	0.016743	0.002813	0.013930
8.438	0.016859	0.002923	0.013935
8.469	0.016974	0.003002	0.013971
8.499	0.017089	0.003023	0.014066
8.524	0.017205	0.003037	0.014168
8.555	0.017320	0.003105	0.014215
8.581	0.017416	0.003146	0.014269
8.606	0.017531	0.003186	0.014345
8.641	0.017646	0.003314	0.014331
8.667	0.017741	0.003379	0.014362

9. APÉNDICE

8.693	0.017876	0.003421	0.014454
8.724	0.017971	0.003443	0.014527
8.752	0.018066	0.003453	0.014613
8.782	0.018161	0.003647	0.014513
8.810	0.018275	0.003693	0.014582
8.836	0.018389	0.003726	0.014664
8.866	0.018484	0.003758	0.014725
8.891	0.018578	0.003801	0.014777
8.919	0.018672	0.003904	0.014768
8.955	0.018766	0.003950	0.014815
8.975	0.018860	0.004011	0.014850
9.006	0.018973	0.004115	0.014858
9.030	0.019067	0.004151	0.014916
9.057	0.019180	0.004168	0.015012
9.083	0.019253	0.004220	0.015033
9.108	0.019346	0.004365	0.014981
9.134	0.019478	0.004411	0.015067
9.154	0.019552	0.004490	0.015062
9.185	0.019643	0.004603	0.015040
9.206	0.019756	0.004687	0.015069
9.233	0.019847	0.004701	0.015146
9.259	0.019958	0.004765	0.015193
9.279	0.020050	0.004855	0.015195
9.302	0.020141	0.004954	0.015187
9.328	0.020232	0.005027	0.015205

9. APÉNDICE

9.350	0.020342	0.005109	0.015233
9.376	0.020431	0.005197	0.015234
9.399	0.020521	0.005274	0.015248
9.422	0.020650	0.005335	0.015315

Apéndice 9.4.

Estudio cinético: hidrólisis discontinua de proteínas del lactosuero con Protex 6L. Consumo de base para mantener el pH constante y grado de hidrólisis.

Tabla A- 10. $s_0 = 50\text{g/L}$, $e_0 = 0.05\text{ g/L}$, $E/S = 0.1\%$, $\text{pH} = 8.5$, $T = 50\text{ }^\circ\text{C}$, $N_B = 1.9487\text{ N}$

t (min)	V (mL)	x	t (min)	V (mL)	x
0	0.000	0.00000	125	19.238	0.04558
5	2.128	0.00504	130	19.752	0.04680
10	3.422	0.00811	135	20.248	0.04797
15	4.558	0.01080	140	20.798	0.04928
20	5.564	0.01318	145	21.324	0.05052
25	6.468	0.01532	150	21.852	0.05177
30	7.296	0.01729	155	22.382	0.05303
35	8.084	0.01915	160	22.884	0.05422
40	8.882	0.02104	165	23.366	0.05536
45	9.614	0.02278	170	23.886	0.05659
50	10.330	0.02447	175	24.388	0.05778
55	11.004	0.02607	180	24.852	0.05888
60	11.702	0.02773	185	25.306	0.05996
65	12.354	0.02927	190	25.752	0.06101
70	13.000	0.03080	195	26.150	0.06196
75	13.636	0.03231	200	26.538	0.06288
80	14.218	0.03369	205	26.908	0.06375
85	14.832	0.03514	210	27.270	0.06461
90	15.378	0.03643	215	27.608	0.06541
95	15.950	0.03779	220	27.940	0.06620
100	16.500	0.03909	225	28.328	0.06712
105	17.070	0.04044	230	28.702	0.06800

9. APÉNDICE

110	17.614	0.04173		235	29.084	0.06891
115	18.156	0.04302		240	29.466	0.06981
120	18.678	0.04425				

Tabla A- 11. $s_0 = 25 \text{ g/L}$, $e_0 = 0.5 \text{ g/L}$, $E/S = 2 \%$, $\text{pH} = 8.5$, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $N_B = 1.9487 \text{ N}$

t (min)	V (mL)	x	t (min)	V (mL)	x
0	0.000	0.00000	125	38.272	0.18135
5	11.492	0.05446	130	38.596	0.18289
10	17.436	0.08262	135	38.906	0.18436
15	21.304	0.10095	140	39.212	0.18581
20	23.842	0.11298	145	39.496	0.18715
25	25.736	0.12195	150	39.776	0.18848
30	27.244	0.12910	155	40.046	0.18976
35	28.466	0.13489	160	40.264	0.19079
40	29.556	0.14005	165	40.524	0.19202
45	30.468	0.14437	170	40.768	0.19318
50	31.282	0.14823	175	41.024	0.19439
55	32.006	0.15166	180	41.266	0.19554
60	32.660	0.15476	185	41.510	0.19670
65	33.274	0.15767	190	41.748	0.19782
70	33.788	0.16011	195	42.002	0.19903
75	34.320	0.16263	200	42.264	0.20027
80	34.826	0.16502	205	42.510	0.20143
85	35.282	0.16718	210	42.748	0.20256
90	35.726	0.16929	215	42.966	0.20360
95	36.138	0.17124	220	43.166	0.20454
100	36.518	0.17304	225	43.374	0.20553

9. APÉNDICE

105	36.890	0.17480	230	43.576	0.20649
110	37.244	0.17648	235	43.786	0.20748
115	37.596	0.17815	240	43.996	0.20848
120	37.934	0.17975			

Tabla A- 12. $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 0.5$ g/L, E/S = 1 %, pH = 8.5, T = 50 °C, NB = 1.9487 N

t (min)	V (mL)	x	t (min)	V (mL)	x
0	0.000	0.00000	125	62.454	0.14797
5	12.318	0.02918	130	63.154	0.14963
10	20.000	0.04739	135	63.760	0.15106
15	26.840	0.06359	140	64.346	0.15245
20	31.794	0.07533	145	64.954	0.15389
25	35.696	0.08457	150	65.520	0.15523
30	38.868	0.09209	155	66.102	0.15661
35	41.538	0.09841	160	66.638	0.15788
40	43.826	0.10384	165	67.204	0.15922
45	45.746	0.10838	170	67.732	0.16048
50	47.492	0.11252	175	68.270	0.16175
55	49.030	0.11617	180	68.810	0.16303
60	50.458	0.11955	185	69.304	0.16420
65	51.742	0.12259	190	69.794	0.16536
70	52.936	0.12542	195	70.226	0.16638
75	54.026	0.12800	200	70.620	0.16732
80	55.050	0.13043	205	71.072	0.16839
85	56.018	0.13272	210	71.516	0.16944
90	56.958	0.13495	215	71.954	0.17048
95	57.856	0.13708	220	72.378	0.17148

9. APÉNDICE

100	58.722	0.13913		225	72.838	0.17257
105	59.534	0.14105		230	73.180	0.17338
110	60.292	0.14285		235	73.578	0.17433
115	61.058	0.14466		240	73.982	0.17528
120	61.776	0.14636				

Tabla A- 13. $s_0 = 50$ g/L, $e_0 = 2.5$ g/L, E/S = 5 %, pH = 8.5, T = 50 °C, NB = 1.9487 N

t (min)	V (mL)	x		t (min)	V (mL)	x
0	0.000	0.00000		125	89.218	0.21138
5	35.300	0.08364		130	89.870	0.21293
10	48.136	0.11405		135	90.486	0.21439
15	54.984	0.13027		140	91.074	0.21578
20	59.430	0.14081		145	91.624	0.21708
25	63.002	0.14927		150	92.188	0.21842
30	65.922	0.15619		155	92.734	0.21971
35	68.348	0.16193		160	93.258	0.22095
40	70.448	0.16691		165	93.770	0.22217
45	72.328	0.17136		170	94.270	0.22335
50	74.026	0.17539		175	94.774	0.22454
55	75.574	0.17905		180	95.264	0.22571
60	77.006	0.18245		185	95.720	0.22679
65	78.328	0.18558		190	96.154	0.22781
70	79.576	0.18854		195	96.588	0.22884
75	80.706	0.19121		200	97.024	0.22988
80	81.766	0.19373		205	97.446	0.23088
85	82.764	0.19609		210	97.806	0.23173
90	83.724	0.19836		215	98.162	0.23257

9. APÉNDICE

95	84.622	0.20049	220	98.532	0.23345
100	85.476	0.20252	225	98.896	0.23431
105	86.288	0.20444	230	99.260	0.23517
110	87.082	0.20632	235	99.612	0.23601
115	87.818	0.20806			
120	88.534	0.20976			

Tabla A- 14. $s_0 = 25 \text{ g/L}$, $e_0 = 0.25 \text{ g/L}$, $E/S = 1 \%$, $\text{pH} = 8.5$, $T = 50 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{NB} = 1.9487 \text{ N}$

<u>t (min)</u>	<u>V (mL)</u>	<u>x</u>	<u>t (min)</u>	<u>V (mL)</u>	<u>x</u>
0	0.000	0.00000	125	33.282	0.15771
5	7.126	0.03377	130	33.570	0.15907
10	11.782	0.05583	135	33.854	0.16042
15	15.192	0.07199	140	34.136	0.16175
20	17.792	0.08431	145	34.420	0.16310
25	19.942	0.09450	150	34.684	0.16435
30	21.550	0.10212	155	34.956	0.16564
35	22.922	0.10862	160	35.218	0.16688
40	24.104	0.11422	165	35.464	0.16805
45	25.110	0.11898	170	35.718	0.16925
50	25.988	0.12314	175	35.958	0.17039
55	26.782	0.12691	180	36.202	0.17154
60	27.492	0.13027	185	36.444	0.17269
65	28.148	0.13338	190	36.654	0.17369
70	28.726	0.13612	195	36.864	0.17468
75	29.256	0.13863	200	37.060	0.17561
80	29.758	0.14101	205	37.256	0.17654
85	30.270	0.14344	210	37.462	0.17751

9. APÉNDICE

90	30.712	0.14553	215	37.674	0.17852
95	31.142	0.14757	220	37.894	0.17956
100	31.538	0.14944	225	38.092	0.18050
105	31.908	0.15120	230	38.274	0.18136
110	32.288	0.15300	235	38.452	0.18221
115	32.628	0.15461	240	38.646	0.18313
120	32.970	0.15623			

Tabla A- 15. $s_0 = 100$ g/L, $e_0 = 0.5$ g/L, $E/S = 0.5$ %, $pH = 8.5$, $T = 50$ °C, $NB = 2.0053$ N

t (min)	V (mL)	x	t (min)	V (mL)	x
0	0.000	0.00000	125	94.864	0.11564
5	13.068	0.01593	130	96.178	0.11724
10	22.020	0.02684	135	97.458	0.11881
15	29.732	0.03624	140	98.698	0.12032
20	36.622	0.04464	145	99.958	0.12185
25	42.692	0.05204	150	101.168	0.12333
30	48.082	0.05861	155	102.322	0.12473
35	52.846	0.06442	160	103.396	0.12604
40	57.106	0.06961	165	104.432	0.12731
45	60.938	0.07429	170	105.438	0.12853
50	64.382	0.07848	175	106.418	0.12973
55	67.466	0.08224	180	107.354	0.13087
60	70.282	0.08568	185	108.266	0.13198
65	72.888	0.08885	190	109.204	0.13312
70	75.318	0.09182	195	110.106	0.13422
75	77.620	0.09462	200	111.042	0.13536
80	79.822	0.09731	205	111.952	0.13647

9. APÉNDICE

85	81.886	0.09982	210	112.820	0.13753
90	83.866	0.10224	215	113.712	0.13862
95	85.688	0.10446	220	114.606	0.13971
100	87.404	0.10655	225	115.470	0.14076
105	89.048	0.10855	230	116.302	0.14178
110	90.604	0.11045	235	117.152	0.14281
115	92.110	0.11229	240	117.982	0.14382
120	93.528	0.11401			

Apéndice 9.5.**Tabla A- 16. Estudio cinético: ajuste con funciones splines cúbicas del grado de hidrólisis para la variable intensiva e_0t/s_0 (genzima•min/gproteína).**

e_0t/s_0	x	x_{cal}	$dx/d(e_0t/s_0)$
0.000	0.0000	0.0014	0.7219
0.001	0.0015	0.0021	0.7093
0.005	0.0047	0.0048	0.6611
0.010	0.0079	0.0080	0.6056
0.050	0.0222	0.0261	0.3568
0.100	0.0446	0.0421	0.2929
0.2	0.0696	0.0681	0.2296
0.3	0.0857	0.0882	0.1731
0.4	0.0973	0.1031	0.1268
0.5	0.1065	0.1139	0.0912
0.6	0.1140	0.1217	0.0664
0.7	0.1254	0.1276	0.0523
0.8	0.1326	0.1325	0.0476
0.9	0.1372	0.1371	0.0445
1.0	0.1408	0.1414	0.0415
1.1	0.1444	0.1454	0.0387
1.2	0.1479	0.1492	0.0361
1.3	0.1506	0.1526	0.0336
1.4	0.1536	0.1559	0.0314
1.5	0.1562	0.1589	0.0293
1.6	0.1586	0.1618	0.0274
1.7	0.1608	0.1644	0.0256
1.8	0.1630	0.1669	0.0240

9. APÉNDICE

1.9	0.1650	0.1692	0.0227
2.0	0.1669	0.1714	0.0214
2.1	0.1688	0.1735	0.0203
2.2	0.1705	0.1755	0.0193
2.3	0.1722	0.1774	0.0183
2.4	0.1738	0.1791	0.0173
2.5	0.1754	0.1808	0.0164
2.6	0.1769	0.1824	0.0155
2.7	0.1844	0.1839	0.0147
2.8	0.1798	0.1854	0.0139
2.9	0.1811	0.1867	0.0132
3.0	0.1824	0.1880	0.0125
3.1	0.1837	0.1892	0.0118
3.2	0.1850	0.1904	0.0112
3.3	0.1862	0.1915	0.0107
3.4	0.1874	0.1925	0.0102
3.5	0.1885	0.1935	0.0097
3.6	0.1955	0.1944	0.0093
3.7	0.1907	0.1954	0.0089
3.8	0.1917	0.1962	0.0086
3.9	0.1928	0.1971	0.0083
4.0	0.1937	0.1979	0.0081
4.1	0.1947	0.1987	0.0078
4.2	0.1956	0.1995	0.0076
4.3	0.1966	0.2002	0.0074
4.4	0.1975	0.2010	0.0073
4.5	0.1984	0.2017	0.0071

9. APÉNDICE

4.6	0.1992	0.2024	0.0069
4.7	0.2001	0.2030	0.0067
4.8	0.2009	0.2037	0.0066
4.9	0.2017	0.2044	0.0064
5.0	0.2025	0.2050	0.0063
5.2	0.2044	0.2065	0.0059
5.5	0.2063	0.2080	0.0057
6.0	0.2098	0.2107	0.0052
6.5	0.2129	0.2132	0.0050
7.0	0.2158	0.2157	0.0050
7.5	0.2184	0.2182	0.0050
8.0	0.2210	0.2207	0.0049
8.5	0.2234	0.2232	0.0048
9.0	0.2257	0.2255	0.0047
9.5	0.2278	0.2278	0.0044
10.0	0.2299	0.2299	0.0041
10.5	0.2317	0.2319	0.0037
11.0	0.2334	0.2336	0.0033
11.5	0.2352	0.2352	0.0028
11.9	0.2367	0.2363	0.0023

Apéndice 9.6.

Programa en ISIM para la simulación de la hidrólisis en discontinuo de las proteínas de lactosuero con Protex 6L.

```

:estudio cinetico WPC-Protex-discontinuo
constant es=0.005 :g enzima/g proteina
constant e=1 :g enzima/L
constant n0=148 :enlaces/peptido
constant x0=0
constant tfin=360 :min
constant cint=0.05
constant noci=20
1 sim;interact;reset;goto 1
initial
x=x0
s0=e/es
print "es=",es,"e=",e,"s0=",s0
dynamic
if (x.le.0.025) goto 2
if (x.gt.0.025.and.x.lt.0.13) goto 3
if (x.ge.0.13) goto 4
2 x'=fr*fa*fc*(es)
fr=4.2743*exp(-39.92*x)
n=(n0*(1-x))/(1+n0*x)
fa=(3/n**(1/3))+(1/n)-(3/n**(2/3))
fc=(0.35-x)
goto 10
3 x'=fr*fa*fc*(es)
fr=1.8143-12.087*x
n=(n0*(1-x))/(1+n0*x)
fa=(3/n**(1/3))+(1/n)-(3/n**(2/3))
fc=(0.35-x)
goto 10
4 x'=fr*fa*fc*(es)
fr=3.5851*exp(-20.041*x)
n=(n0*(1-x))/(1+n0*x)
fa=(3/n**(1/3))+(1/n)-(3/n**(2/3))
fc=(0.35-x)
goto 10
10 conv=-9.3177*x*x+5.825*x
c=(conv*(1-0.0572))/(6.38*(t+0.000001)*es)
prod=c*e
prepare t,x,conv,c,prod
output t,x,conv,c,prod
plot t,x,0,tfin,0,0.5

```

Apéndice 9.7.

Simulación mediante ISIM de la hidrólisis enzimática en discontinuo de las proteínas del lactosuero con Protex 6 L.

Tabla A- 17. E/S = 0.005, T = 50 °C, pH = 8.5

t (min)	x	Conversión	Capacidad
0	0.00000	0.00000	0.00000
5	0.01504	0.08550	0.50537
10	0.02533	0.14158	0.41842
15	0.03356	0.18499	0.36449
20	0.04138	0.22507	0.33260
25	0.04873	0.26172	0.30941
30	0.05560	0.29505	0.29068
35	0.06199	0.32528	0.27468
40	0.06792	0.35267	0.26058
45	0.07343	0.37747	0.24792
50	0.07853	0.39995	0.23641
55	0.08325	0.42035	0.22588
60	0.08763	0.43888	0.21618
65	0.09168	0.45573	0.20722
70	0.09545	0.47109	0.19890
75	0.09894	0.48511	0.19116
80	0.10218	0.49792	0.18395
85	0.10520	0.50966	0.17721
90	0.10800	0.52042	0.17090
95	0.11061	0.53031	0.16498
100	0.11304	0.53941	0.15942
105	0.11531	0.54779	0.15419

9. APÉNDICE

110	0.11742	0.55552	0.14926
115	0.11940	0.56266	0.14460
120	0.12124	0.56927	0.14021
125	0.12297	0.57539	0.13604
130	0.12458	0.58106	0.13210
135	0.12609	0.58633	0.12836
140	0.12750	0.59122	0.12481
145	0.12882	0.59577	0.12143
150	0.13007	0.60003	0.11822
155	0.13136	0.60441	0.11525
160	0.13262	0.60863	0.11242
165	0.13384	0.61270	0.10975
170	0.13502	0.61663	0.10720
175	0.13617	0.62043	0.10478
180	0.13729	0.62410	0.10247
185	0.13839	0.62766	0.10027
190	0.13945	0.63111	0.09817
195	0.14049	0.63444	0.09616
200	0.14150	0.63768	0.09423
205	0.14249	0.64083	0.09239
210	0.14346	0.64388	0.09062
215	0.14440	0.64685	0.08892
220	0.14533	0.64974	0.08729
225	0.14623	0.65254	0.08572
230	0.14711	0.65528	0.08420
235	0.14798	0.65794	0.08275
240	0.14883	0.66054	0.08134

9. APÉNDICE

245	0.14966	0.66307	0.07999
250	0.15047	0.66553	0.07868
255	0.15127	0.66794	0.07742
260	0.15206	0.67029	0.07619
265	0.15282	0.67259	0.07501
270	0.15358	0.67483	0.07387
275	0.15432	0.67702	0.07276
280	0.15505	0.67916	0.07169
285	0.15577	0.68126	0.07065
290	0.15647	0.68331	0.06964
295	0.15716	0.68532	0.06866
300	0.15784	0.68728	0.06771
305	0.15851	0.68921	0.06679
310	0.15917	0.69109	0.06589
315	0.15982	0.69294	0.06502
320	0.16045	0.69475	0.06417
325	0.16108	0.69653	0.06334
330	0.16170	0.69827	0.06254
335	0.16231	0.69998	0.06176
340	0.16291	0.70166	0.06099
345	0.16350	0.70330	0.06025
355	0.16466	0.70650	0.05882
360	0.16522	0.70806	0.05813

Tabla A- 18. E/S = 0.01, T = 50 °C, pH = 8.5

t (min)	x	Conversión	Capacidad
0	0.00000	0.00000	0.00000

9. APÉNDICE

5	0.02532	0.14150	0.41819
10	0.04136	0.22500	0.33249
15	0.05558	0.29498	0.29060
20	0.06791	0.35260	0.26052
25	0.07851	0.39989	0.23637
30	0.08761	0.43881	0.21615
35	0.09543	0.47103	0.19888
40	0.10217	0.49787	0.18393
45	0.10799	0.52038	0.17088
50	0.11303	0.53936	0.15941
55	0.11741	0.55548	0.14925
60	0.12123	0.56923	0.14020
65	0.12457	0.58103	0.13209
70	0.12749	0.59119	0.12480
75	0.13006	0.60000	0.11822
80	0.13261	0.60860	0.11242
85	0.13501	0.61661	0.10720
90	0.13729	0.62408	0.10247
95	0.13944	0.63108	0.09817
100	0.14150	0.63766	0.09423
105	0.14345	0.64386	0.09062
110	0.14532	0.64972	0.08728
115	0.14711	0.65526	0.08420
120	0.14882	0.66052	0.08134
125	0.15047	0.66551	0.07868
130	0.15205	0.67027	0.07619
135	0.15357	0.67481	0.07387

9. APÉNDICE

140	0.15504	0.67915	0.07169
145	0.15646	0.68329	0.06964
150	0.15784	0.68727	0.06771
155	0.15916	0.69108	0.06589
160	0.16045	0.69474	0.06417
165	0.16169	0.69826	0.06254
170	0.16290	0.70164	0.06099
175	0.16408	0.70491	0.05952
180	0.16522	0.70805	0.05813
185	0.16633	0.71109	0.05680
190	0.16741	0.71402	0.05553
195	0.16846	0.71686	0.05433
200	0.16949	0.71960	0.05317
205	0.17049	0.72226	0.05206
210	0.17146	0.72483	0.05101
215	0.17241	0.72733	0.04999
220	0.17334	0.72975	0.04902
225	0.17425	0.73210	0.04808
230	0.17514	0.73438	0.04718
235	0.17601	0.73660	0.04632
240	0.17686	0.73876	0.04549
245	0.17769	0.74086	0.04469
250	0.17851	0.74290	0.04391
255	0.17931	0.74490	0.04317
260	0.18009	0.74684	0.04245
265	0.18086	0.74873	0.04175
270	0.18161	0.75057	0.04108

9. APÉNDICE

275	0.18235	0.75237	0.04043
280	0.18308	0.75413	0.03980
285	0.18379	0.75584	0.03919
290	0.18449	0.75752	0.03860
295	0.18518	0.75916	0.03803
300	0.18586	0.76076	0.03747
305	0.18652	0.76232	0.03694
310	0.18718	0.76385	0.03641
315	0.18782	0.76535	0.03591
320	0.18845	0.76682	0.03541
325	0.18907	0.76825	0.03493
330	0.18969	0.76966	0.03447
335	0.19029	0.77104	0.03401
340	0.19088	0.77239	0.03357
345	0.19147	0.77371	0.03314
355	0.19261	0.77628	0.03231
360	0.19317	0.77753	0.03192

Tabla A- 19. E/S = 0.05, T = 50 °C, pH = 8.5

t (min)	x	Conversión	Capacidad
0	0.00000	0.00000	0.00000
5	0.07843	0.39954	0.23616
10	0.11296	0.53909	0.15933
15	0.13001	0.59981	0.11818
20	0.14145	0.63751	0.09421
25	0.15043	0.66539	0.07866
30	0.15780	0.68716	0.06770

9. APÉNDICE

35	0.16404	0.70481	0.05952
40	0.16945	0.71952	0.05316
45	0.17422	0.73202	0.04808
50	0.17848	0.74284	0.04391
55	0.18233	0.75231	0.04043
60	0.18583	0.76070	0.03747
65	0.18905	0.76820	0.03493
70	0.19202	0.77496	0.03272
75	0.19478	0.78109	0.03078
80	0.19736	0.78668	0.02906
85	0.19977	0.79181	0.02753
90	0.20204	0.79653	0.02616
95	0.20418	0.80091	0.02492
100	0.20621	0.80496	0.02379
105	0.20814	0.80874	0.02276
110	0.20997	0.81227	0.02182
115	0.21171	0.81558	0.02096
120	0.21338	0.81869	0.02016
125	0.21498	0.82162	0.01943
130	0.21651	0.82438	0.01874
135	0.21797	0.82699	0.01811
140	0.21939	0.82946	0.01751
145	0.22075	0.83181	0.01695
150	0.22206	0.83404	0.01643
155	0.22333	0.83616	0.01594
160	0.22455	0.83818	0.01548
165	0.22573	0.84011	0.01505

9. APÉNDICE

170	0.22688	0.84195	0.01464
175	0.22799	0.84371	0.01425
180	0.22907	0.84540	0.01388
185	0.23011	0.84702	0.01353
190	0.23113	0.84857	0.01320
195	0.23212	0.85006	0.01288
200	0.23308	0.85149	0.01258
205	0.23401	0.85287	0.01230
210	0.23493	0.85420	0.01202
215	0.23582	0.85548	0.01176
220	0.23668	0.85671	0.01151
225	0.23753	0.85790	0.01127
230	0.23835	0.85905	0.01104
235	0.23916	0.86016	0.01082
240	0.23995	0.86123	0.01061
245	0.24072	0.86227	0.01040
250	0.24148	0.86328	0.01021
255	0.24221	0.86425	0.01002
260	0.24294	0.86519	0.00983
265	0.24365	0.86611	0.00966
270	0.24434	0.86699	0.00949
275	0.24502	0.86785	0.00933
280	0.24569	0.86869	0.00917
285	0.24634	0.86950	0.00902
290	0.24698	0.87029	0.00887
295	0.24761	0.87106	0.00873
300	0.24823	0.87180	0.00859

9. APÉNDICE

305	0.24884	0.87253	0.00845
310	0.24943	0.87323	0.00833
315	0.25002	0.87392	0.00820
320	0.25060	0.87459	0.00808
325	0.25116	0.87524	0.00796
330	0.25172	0.87587	0.00784
335	0.25227	0.87649	0.00773
340	0.25281	0.87709	0.00762
345	0.25334	0.87768	0.00752
355	0.25437	0.87882	0.00732
360	0.25488	0.87936	0.00722

Tabla A- 20. E/S = 0.1, T = 50 °C, pH = 8.5

t (min)	x	Conversión	Capacidad
0	0.00000	0.00000	0.00000
5	0.11295	0.53907	0.15932
10	0.14142	0.63744	0.09420
15	0.15778	0.68710	0.06769
20	0.16943	0.71946	0.05316
25	0.17846	0.74279	0.04391
30	0.18582	0.76066	0.03747
35	0.19201	0.77493	0.03272
40	0.19734	0.78665	0.02906
45	0.20203	0.79651	0.02616
50	0.20620	0.80494	0.02379
55	0.20995	0.81225	0.02182
60	0.21337	0.81867	0.02016

9. APÉNDICE

65	0.21649	0.82436	0.01874
70	0.21938	0.82944	0.01751
75	0.22205	0.83402	0.01643
80	0.22454	0.83816	0.01548
85	0.22687	0.84194	0.01464
90	0.22906	0.84539	0.01388
95	0.23112	0.84856	0.01320
100	0.23307	0.85148	0.01258
105	0.23492	0.85419	0.01202
110	0.23667	0.85670	0.01151
115	0.23835	0.85904	0.01104
120	0.23994	0.86122	0.01061
125	0.24147	0.86327	0.01021
130	0.24293	0.86518	0.00983
135	0.24433	0.86699	0.00949
140	0.24568	0.86868	0.00917
145	0.24698	0.87028	0.00887
150	0.24822	0.87179	0.00859
155	0.24943	0.87322	0.00833
160	0.25059	0.87458	0.00808
165	0.25172	0.87587	0.00784
170	0.25280	0.87709	0.00762
175	0.25386	0.87825	0.00742
180	0.25488	0.87936	0.00722
185	0.25587	0.88041	0.00703
190	0.25683	0.88142	0.00686
195	0.25776	0.88238	0.00669

9. APÉNDICE

200	0.25867	0.88330	0.00653
205	0.25955	0.88418	0.00637
210	0.26041	0.88502	0.00623
215	0.26125	0.88583	0.00609
220	0.26207	0.88661	0.00596
225	0.26286	0.88735	0.00583
230	0.26364	0.88806	0.00571
235	0.26440	0.88875	0.00559
240	0.26514	0.88941	0.00548
245	0.26586	0.89005	0.00537
250	0.26657	0.89066	0.00526
255	0.26726	0.89125	0.00516
260	0.26794	0.89181	0.00507
265	0.26860	0.89236	0.00498
270	0.26925	0.89289	0.00489
275	0.26989	0.89340	0.00480
280	0.27051	0.89389	0.00472
285	0.27112	0.89437	0.00464
290	0.27172	0.89483	0.00456
295	0.27231	0.89527	0.00448
300	0.27288	0.89570	0.00441
305	0.27345	0.89611	0.00434
310	0.27400	0.89652	0.00427
315	0.27455	0.89691	0.00421
320	0.27508	0.89728	0.00414
325	0.27561	0.89765	0.00408
330	0.27613	0.89800	0.00402

9. APÉNDICE

335	0.27664	0.89835	0.00396
340	0.27714	0.89868	0.00391
345	0.27763	0.89900	0.00385
355	0.27859	0.89962	0.00374
360	0.27906	0.89991	0.00369