

Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas

Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins

GUADIX, A.; GUADIX, E. M.; PÁEZ-DUEÑAS, M. P.; GONZÁLEZ-TELLO, P. Y CAMACHO, F.

Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada. 18071 Granada. España
e-mail: eguadix@goliat.ugr.es

RESUMEN

Los hidrolizados de proteínas se utilizan ampliamente en tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante). En este trabajo se describen las técnicas empleadas para la obtención de estos hidrolizados y se comparan los diferentes métodos usados para el control de estos preparados: determinación del grado de hidrólisis, tamaño de los péptidos, distribución de pesos moleculares y contenido en aminoácidos y péptidos.

PALABRAS CLAVE: hidrolizados de proteínas, grado de hidrólisis, tamaño de los péptidos, distribución de pesos moleculares

ABSTRACT

Protein hydrolysates are widely used in food technology for its nutritional or functional properties (solubility, emulsifying power, foaming capacity). In this paper, the techniques used for obtaining these hydrolysates are described and it is compared the different methods for the control of these preparations: determination of the hydrolysis degree, peptide size, molecular weight distribution and amino acid and peptide contents.

KEY WORDS: protein hydrolysates, degree of the hydrolysis, peptide size, molecular weight distribution.

INTRODUCCIÓN

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas 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 1983).

Las características que deben cumplir estos hidrolizados de proteínas para formar parte de una dieta enteral son:

- que sean osmóticamente equilibrados
- que sean hipoalérgicos
- presentar un alto valor nutritivo, comparable al de la proteína de partida
- y tener un sabor agradable

Para ello, la hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente a la tradicional hidrólisis química, ácida o alcalina, entre las que caben mencionar las siguientes:

— Selectividad. Las enzimas 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 pro-

ductos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos.

— Condiciones moderadas de temperatura y pH. La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40° a 60°C y pH comprendido entre 4-8

— No se añaden sustancias extrañas. Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales.

— 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 la hidrólisis enzimática de proteínas es necesario separar o desnaturar la enzima y trabajar en condiciones asépticas, ya que por ser un proceso relativamente lento, puede producirse contaminación microbiana de la mezcla reaccionante. Sin embargo, la desnaturación térmica de 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.

Por otra parte 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 *et al.* 1986).

También se conoce que los problemas de alergenicidad 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, que parece estar relacionado con la hidrofobicidad de las cadenas laterales y con la fuente proteínica utilizada. Pero en cualquier caso, ambos factores desaparecen para productos formados por péptidos de peso molecular inferior a 1000 Da (Otani *et al.* 1990).

Por tanto, el control del proceso de reacción y la caracterización de los hidrolizados en base al tamaño de los péptidos son objetivos importantes en la hidrólisis de proteínas.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

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.

Así, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suelen emplear colágeno y gelatina por su ya conocida capacidad para formar geles transparentes (Adler-Nissen y Olsen 1979). También se ha extendido el uso de proteínas de huevo (Lind y Lee 1983), de carne (Smith y Brekke 1984), de sangre e incluso de cereales (Sarkki *et al.* 1979) para este fin.

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, siendo éstas últimas, especialmente las proteínas del lactosuero, la materia prima ideal para la preparación de alimentos infantiles y dietas enterales (Nakamura *et al.* 1993).

Proteasas comerciales

Las proteasas pueden clasificarse según:

— el origen - animal, vegetal, bacteriano o fúngico -

— su acción catalítica - en endopeptidasas o proteinasas si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas, y exopeptidasas o peptidasas, si separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas -

— la naturaleza del sitio catalítico - así las endopeptidasas pueden ser serina-, cisteína-, metalo-, o aspartato-proteinasas y las exopeptidasas amino-, carboxi- o dipeptidasas.

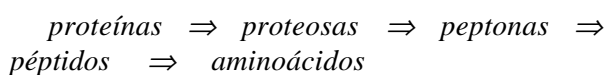
TABLA I.
Características de algunas proteasas comerciales.

Enzima	Origen	Estabilidad	
		pH	T (°C)
Alcalasa 0.6L	<i>B. licheniformis</i>	4 < pH < 11.5	50 < T < 60
Neutrasa	<i>B. subtilis</i>	6 < pH < 8	45 < T < 55
Protease 660L	<i>B. subtilis</i>	7 < pH < 10	50 < T < 70
Fungal-Protease	<i>A. oryzae</i>	6 < pH < 9	45 < T < 55
P.E.M. 2500 S	tripsina porcina	6 < pH < 10	30 < T < 60
	tripsina bovina	6 < pH < 10	25 < T < 45
	quimiotrp.bovina		
Corlase PP	Tripsina	7 < pH < 9	45 < T < 55
	quimiotripsina		
Corolase PS	<i>A. oryzae</i>	5 < pH < 7	50 < T < 60
Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	6 < pH < 8.5	55 < 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
Bromelina Takamina	vegetal (piña)	4 < pH < 9	20 < T < 65
Papaina Takamina	vegetal (papaya)	6 < pH < 8	20 < T < 75

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. En la Tabla 1 se recogen algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado. Estos preparados suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o en pellets secos.

Mecanismo de la hidrólisis

La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso que transcurre a través de un conjunto de etapas en serie:

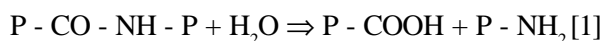


Cada una de estas especies intermedias, se diferencia básicamente de las otras en su solubilidad, y se corresponde aproximadamente con los tamaños moleculares medios (MW) y con la relación nitrógeno amino/nitrógeno total (AN/TN) que se recogen en la Tabla 2 (Knights 1985).

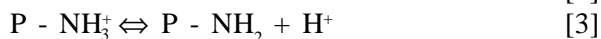
TABLA II.
Características de las especies producidas en la hidrólisis de proteínas.

	MW	AN/TN
proteínas	> 20000	< 0.01
proteasas	5000 - 10000	< 0.01
peptonas	1000 - 6000	0.1 - 0.5
peptidos	200 - 500	0.5 - 0.8
aminoácidos	75 - 200	0.8 - 0.9

La proteasa actúa sobre el enlace peptídico, rompiéndolo, y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo según la siguiente ecuación:



Los grupos amino y carboxilo formados tras la hidrólisis pueden estar parcialmente ionizados, dependiendo del pH del proceso de hidrólisis, y según los siguientes equilibrios:



Se estiman que los valores de pK a 25°C para los grupos -COOH y H_3N^+ en polipéptidos están comprendidos entre 3.1-3.6 y 7.5-7.8 respectivamente (Steinhardt y Beychok 1964; Rupley 1967). Por lo que para $pH < 3.1-3.6$, el grupo ácido estará parcialmente disociado y el grupo amino totalmente protonado. Si se deja incontrolado el pH en esta zona aumenta rápidamente. Si se trabaja a $pH > 7.5-7.8$, el grupo carboxilo estará totalmente disociado y el amino parcialmente protonado, lo que conlleva una bajada continua del pH.

Debe tenerse presente además que la hidrólisis proteolítica no es una sola reacción, sino que se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad a este tipo de procesos.

Producción de hidrolizados

La mayor parte de las investigaciones llevadas a cabo para el estudio de la hidrólisis enzimática

de proteínas se limitan a encontrar las condiciones de operación óptimas en las que realizar el proceso con vistas a la producción industrial de hidrolizados, y sólo unos pocos autores abordan el estudio cinético de la reacción, en base a obtener la ecuación de velocidad en función de las variables del proceso, que permita el diseño del correspondiente reactor, así como un mayor conocimiento y control de la etapa hidrolítica. Esto se debe fundamentalmente 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, inhibición e inactivación de la enzima ...) y su importancia económica, que determina un mayor interés por el desarrollo y patentado de procesos comerciales.

Algunos de estos procesos aún se encuentran a escala planta piloto, apuntando hacia las futuras tecnologías que se implantarán para mejorar la calidad del producto y bajar los costes, como la inmovilización de enzimas, la utilización de módulos de membrana acoplados al reactor enzimático o los tratamientos del sustrato por presión (Mannheim y Cheryan 1990, Haque y Mozaffar 1992, Nakamura *et al.* 1993, Perea *et al.* 1993, Margot *et al.* 1998, Guadix *et al.* 1998).

Otros procesos se encuentran ya totalmente desarrollados y puestos a punto, pero la mayoría de ellos están patentados, por lo que las condiciones en las que se llevan a cabo aparecen siempre descritas con unos márgenes tan amplios que no aportan información de gran valor (Maubois *et al.* 1981, Chiang *et al.* 1982, Chang 1984, Parker y Pawlett 1987, Samuelsson y Poulsen 1987, Chataud *et al.* 1988 a-b, De Rham 1989, Jost *et al.* 1989, Faigh *et al.* 1989, Piske *et al.* 1991, Piske 1991, Nielsen y Hvass 1993).

En cuanto a los estudios cinéticos, como ya se ha indicado, son escasos y generalmente admiten cinética de Michaelis-Menten (Akuzawa *et al.* 1985, Postolache y Oncescu 1989, Tayyab y Qamar 1992, Mukataka *et al.* 1992, Madsen *et al.* 1997) demasiado simple para representar el mecanismo de la hidrólisis de proteínas, o cinéticas empíricas, con 3-5 parámetros de ajuste (Constantínides y Adu-Amankwa 1980, Margot *et al.* 1997) lo que limita su aplicabilidad.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado la cinética de la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero con proteasas comerciales de origen bacteriano y animal. Los datos obtenidos se ajustan a la siguiente ecuación de velocidad

$$r_h = S_0 \frac{dx}{dt} = k_h (e_0 - \epsilon \cdot S_0) \exp\left(-\frac{k_d}{k_h} x\right) \quad [4]$$

en los intervalos de 50-70 °C, pH=8.0-10.0 y grados de hidrólisis de 0-22 % (González-Tello *et al.* 1994a, Camacho *et al.* 1998). El término proporcional a la concentración inicial de sustrato que aparece restando a la concentración de enzima activa en la ecuación cinética, se ha explicado admitiendo la existencia en el sustrato de un inhibidor irreversible de serina-proteinasas (Weber y Nielsen 1991). Este inhibidor actúa asocián-

dose 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 puede explicarse mediante el siguiente mecanismo:

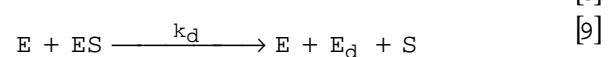
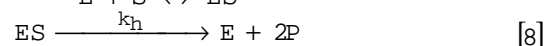
a) Un proceso muy rápido de unión irreversible de la enzima activa al inhibidor presente en el sustrato



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

$$e_{0a} = e_0 - \epsilon \cdot S_0 \quad [6]$$

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



Los valores de los parámetros cinéticos (k_h , k_d , ϵ) para cada uno de los sistemas estudiados se resumen en la Tabla 3

TABLA III.
Constantes cinéticas.

Enzima	k_h , g/UA min	ϵ , UA/g	k_d , g/UA min
Protease 660 L	0.241	0.025	7.95
Alcalasa 0.6 L	0.217	0.017	5.71
PEM 2500 S	0.171	0.029	8.36
Protease+PEM	0.254	0.265	7.51

Estos resultados ponen de manifiesto una mayor eficacia de las proteasas bacterianas frente a la de

origen animal, así como un efecto sinérgico que favorece la hidrólisis en su actuación conjunta.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Se describen a continuación las ventajas y limitaciones de los métodos más usados en la hidrólisis de proteínas para el control del proceso y caracterización de los hidrolizados obtenidos.

Medida de la actividad enzimática

Uno de los procedimientos más empleados para la determinación de la actividad proteolítica de las enzimas es el método modificado de Anson (Novo Industrias 1978).

En este ensayo, se hidroliza hemoglobina desnaturalizada con una cierta cantidad de la proteasa problema a pH=7.5, 25°C y 10 min. La hemoglobina no hidrolizada se precipita con ácido tricloroacético, TCA, y al sobrenadante, después de filtrar, se le añade reactivo fenólico, que produce color azul con tirosina y triptófano (productos de hidrólisis), cuya absorbancia se mide a 750 nm. Para obtener la línea de calibrado se utiliza una proteasa de actividad Anson conocida, usualmente tripsina pancreática, que se somete al mismo ensayo que la proteasa problema (Guadix 1993).

Determinación del grado de hidrólisis

Para el seguimiento y control de la hidrólisis de proteínas es necesario evaluar el grado de hidrólisis, DH, que se define

$$DH = \frac{\text{n}^\circ \text{ enlaces peptídicos hidrolizados}}{\text{n}^\circ \text{ total enlaces peptídicos}} \cdot 100 \quad [10]$$

Los diferentes métodos utilizados para medir el DH se basan fundamentalmente en: 1) la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético, 2) la determinación de los grupos α -amino libres, 3) la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados pHs.

Determinación de nitrógeno soluble: En este caso las técnicas más usuales son: el método Kjeldhal (A.O.A.C. 1995), la reacción de Biuret (Hung *et al.* 1984) o la determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos con grupos aromáticos (Pelissier 1984).

Determinación de los grupos α -amino libres: Para ello puede utilizarse la valoración con

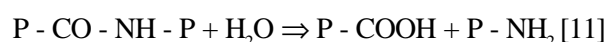
formol (A.O.A.C. 1995, U.S.P. 1989), aunque el gran número de interferencias que presenta este método lo desaconsejan en el caso de los hidrolizados de proteínas. También se utilizan para esta medida productos químicos como ninhidrina, ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), ortophenilaldehído (OPA) que reaccionan con los grupos α -amino libres.

La técnica más antigua es la de reacción con ninhidrina (Moore y Stein 1948) de gran sensibilidad, que presenta el inconveniente de la larga duración de los ensayos y la interferencia del amonio. El método del TNBS (Snyder y Sobocinsky 1975) ha sido utilizado por numerosos autores para el análisis de hidrolizados de proteínas (Adler-Nissen y Olsen 1979, Valls *et al.* 1985, Humbert *et al.* 1990, Camacho *et al.* 1992). Después de la incubación de las muestras durante 1 hora a 37 °C se mide la absorbancia a 420 nm. Entre los inconvenientes de este método pueden mencionarse el alto valor de los blancos, la contaminación del reactivo con ácido picrico, la interferencia de azúcares reductores y amonio, la no reactividad de prolina e hidroxiprolina así como la alteración de los resultados por la reacción de los grupos ϵ -amino de lisina con el reactivo. En cuanto al OPA tiene el inconveniente de no reaccionar con prolina y sólo parcialmente con cisteína.

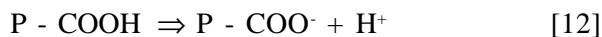
Valoración del protón: método del pH-estato

El control de la hidrólisis enzimática de proteínas a pH alcalino puede ser realizado de forma sencilla y precisa por medida del consumo de base necesario para mantener constante el pH en el reactor de hidrólisis (Adler-Nissen 1986). Sin embargo, este consumo no está relacionado de una forma simple con el grado de hidrólisis alcanzado, siendo necesario para establecer esta relación el conocimiento del pK medio de los grupos α -amino liberados en la hidrólisis (Camacho *et al.* 1999).

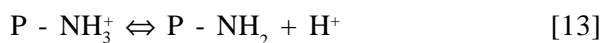
Cuando se hidroliza un enlace amido a pH alcalino, $7 < \text{pH} < 10$:



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, $P\text{-COO}^-$, y un mol de cationes monovalentes repartido entre las dos especies: $P\text{-NH}_3^+$ 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 solo una fracción de los enlaces amido hidrolizados.

El equilibrio de la etapa [13], que puede considerarse instantáneo ya que solo 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:

$$\frac{[P - \text{NH}_2] [\text{H}^+]}{[P - \text{NH}_3^+]} = K \quad [14]$$

siendo K la constante del equilibrio de desprotonación del grupo amino, introduciendo en la ecuación [14] los valores de:

$$K = 10^{-\text{pK}} [\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}} \quad [15]$$

queda:

$$\frac{[P - \text{NH}_2]}{[P - \text{NH}_3^+]} = 10^{\text{pH}-\text{pK}} \quad [16]$$

y la fracción buscada será:

$$\frac{[P - \text{NH}_2]}{[P - \text{NH}_2] + [P - \text{NH}_3^+]} = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad [17]$$

por tanto la relación entre los moles de enlaces amido hidrolizados y los moles de base añadida será:

$$dh = (1 + 10^{\text{pK}-\text{pH}})dB \quad [18]$$

es decir, que para evaluar el grado de hidrólisis es preciso conocer el valor del pK indicado.

Sin embargo, la ecuación [16] debe implicar un promedio de los diferentes grupos α -amino liberados en la hidrólisis, por lo que el valor medio del pK adecuado viene dado por:

$$\text{pK} = \text{pH} - \log \left(\frac{1}{\sum \frac{C_i/C_T}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}_i}}} - 1 \right) \quad [19]$$

siendo C_T los moles/L totales de enlaces amido hidrolizados y C_i los moles/L de un enlace amido determinado.

La ecuación [19] pone de manifiesto que el valor del pK medio puede depender del pH de trabajo. Si se supone una distribución normal de los pK_i de los grupos α -amino liberados, caracterizada por su media, μ , y su desviación estándar, σ , los valores del pK medio, calculados con la ecuación [19], varían con el pH de trabajo en el intervalo de interés (desde el pH al cual están protonados más del 95% de los grupos α -amino liberados hasta el pH al cual están protonados menos del 5% de los grupos α -amino liberados) en forma lineal

$$\text{pK} = \mu + \frac{0.956 * \sigma^2}{1 + 1.353 * \sigma^{1.872}} (\text{pH} - \mu) \quad [20]$$

Para determinar este valor del pK medio adecuado en la hidrólisis de las proteínas del lactosuero con proteasas bacterianas, se ha utilizado un procedimiento basado en la valoración en el rango alcalino de una disolución de la proteína de partida y de otra disolución, de igual concentración, de la proteína parcialmente hidrolizada, obteniéndose que para este sistema el pK varía con el pH de trabajo según la ecuación

$$\text{pK} = 3.80 + 0.45\text{pH} \quad [21]$$

Distribución de tamaños moleculares

La distribución de tamaños de los péptidos de un hidrolizado puede ser útil para predecir la capacidad antigénica del mismo así como para mostrar diferencias en la actuación de distintos pretratamientos del sustrato o enzimas utilizadas. Normalmente se utilizan métodos cromatográficos o electroforéticos para este fin.

La electroforesis en gel, SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) ha sido la técnica más utilizada para la caracterización de hidrolizados y proteínas (Desphande y Nielsen 1987, Leaver y Thomson 1993, Perea et al. 1993, Parrado et al. 1993) a pesar de sus limitaciones en la separación de péptidos de peso molecular bajo. La cromatografía en gel con columnas de Sephadex G-25 o G-50, ha sido el método elegido por Takase et al. 1979, Vallejo-Córdoba et al. 1986, Behnke et al. 1989, Quaglia y Orban 1990, Deeslie y Cheryan 1988. No obstante, el método que mejores resultados ha dado - por su mayor resolución y más fácil cuantificación- ha sido la cromatografía líquida de exclusión, SE-HPLC, con columnas de TSK-gel (Mahmoud et al. 1992, González-Tello et al. 1994b).

En la caracterización por esta última técnica de los hidrolizados de proteínas de lactosuero con proteasas de origen animal, bacteriano y mezclas de ambas, que se realizó en nuestros laboratorios, se observó que en todos los siste-

mas estudiados la distribución de tamaños era función de la enzima utilizada y del grado de hidrólisis alcanzado pero prácticamente independiente de las condiciones de operación empleadas. También se comprobó que a altos grados de hidrólisis, los productos obtenidos con mezclas de proteasas presentaban la mejor composición en cuanto a mayor porcentaje de fracción de bajo peso molecular. La evolución de las distintas fracciones con el grado de hidrólisis se muestra, a título de ejemplo, en la figura 1.

Separación e identificación de péptidos y aminoácidos

Una correcta separación e identificación de los péptidos de un hidrolizado de proteínas complementaría la información dada por la determinación del grado de hidrólisis y la distribución en pesos moleculares, y ayudaría a un mejor conocimiento de la composición del producto.

Electroforesis (SDS-PAGE) y cromatografía (fase reversa, RP-HPLC; exclusión, SE-HPLC; filtración en gel, cambio iónico) han sido las técnicas más empleadas en la separación de péptidos y aminoácidos, mientras que para la identificación de los mismos, después del fraccionamiento, se ha utilizado generalmente espectrometría de masas, cromatografía gaseosa, análisis de secuencias o determinación de aminoácidos.

Pueden citarse aquí los trabajos de Yvon et al. 1989, Perea et al. 1993, Chen et al. 1995, Reid et al. 1994, Gallagher et al. 1994, Minagawa et al. 1989, Pellerin et al. 1985, Visser et al. 1992.

Mención especial merecen las investigaciones realizadas por Lemieux and Amiot (1989, 1990) en este campo. Estos autores evaluaron las distintas técnicas empleadas para la separación de péptidos, llegando a la conclusión que la cromatografía líquida de exclusión, SE-HPLC, es la técnica que mayor información aporta sobre la composición del hidrolizado, ya que es el volumen molecular el criterio de separación empleado, y no el estado de ionización, la carga o la hidrofobicidad de los péptidos como en otras técnicas, que no obstante pueden ser complementarias. También pusieron de manifiesto la ineficacia de los distintos métodos en la separación de péptidos de peso molecular inferior a 1000 Da. En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas capaces de separar y cuantificar los péptidos de PM<1000

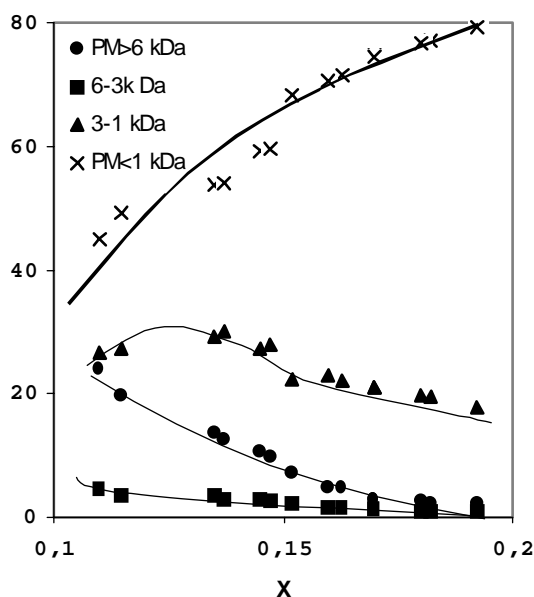


FIGURA 1

Da puede ser importante, especialmente si el hidrolizado se va a utilizar en la formulación de dietas enterales, en cuyo caso debe estar constituido fundamentalmente por di- y tripéptidos.

BIBLIOGRAFÍA

- A.O.A.C. (1995). Official methods of analysis, 16 ed., Horowitz, Washington DC, USA, **12**, p.7.
- Adler-Nissen J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
- Adler-Nissen J. y Olsen H.S.(1979). The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *ACS Symp. Ser.*, **92**:125-146.
- Akuzawa R., Ito O. y Yokoyawa K. (1985). Degradation of casein by crystalline low-temperature-active proteinase from *Streptococcus lactis*. *Japan J. Zootech. Sci.* **56(1)**:56-60.
- Behnke U., Jurisová E., Belajová E., Haas J. y Blumhagen H. (1989). Enzymatic hydrolysis of maize protein. *Die Nahrung.*, **4**:361-376.
- 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. y Guadix, E.M. (1998). Influence of enzymes, pH and temperature on the kinetics of whey protein hydrolysis. *Food Sci. Techn. Inter.* **4**:79-84.
- Camacho F., Páez M.P. Guadix E.M. y Guadix A. (1999). Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis: degree of hydrolysis-soluble nitrogen content-average molecular weight. *8th Mediterranean Congress of Chemical Engineering.*, **8**:363.
- Chang R.L. (1984). Process for the preparation of protein for hydrolysis. *United States Patent*, 4 482 574.
- 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. *Demande de Brevet Européen A2 0 274 939*.
- Chataud J., Desreumaux S. y Cartwright, T.(1988 b). Procédé de fabrication d'un hydrolysate enzymatique de protéines riche en di-et-tri-peptides, utilisable notamment en nutrition artificielle et en diététique. *Demande de Brevet Européen A1 0 274 946*.
- Chen H.M., Muramoto K. Y Yamauchi F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycin. *J. Food Agric. Chem.*, **43**:574-578.
- 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 A1 0 065 663*.
- 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. *Biotech. Bioeng.* **22**:1543-1565.
- De Rham O. (1989). Procédé de préparation d'un produit lactosérique à allergénicité réduite. *European Patent Application A1 0 311 795*.
- 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.
- Desphande S.S. y Nielsen S.S. (1987). In vitro enzymatic hydrolysis of phaseolin, the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* L. *J. food Sci.*, **52(5)**:1326-1329.
- Faigh J.G., Stuart M.J. y Talbott L.L. (1989). Enzymatic hydrolysis of proteins. *European Patent Application A2 0 325 986*.
- Gallagher J., Kanekian A.D. y Evans P. (1994). Hydrolysis of casein: a comparative study of two proteases and their peptide maps. *Int. J. food Sci. Technol.*, **29**:279-285.
- González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Páez M.P. y Guadix E.M. (1994a). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models. *Biotech. Bioeng.* **44**: 523-528.
- González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Páez M.P. y Guadix E.M. (1994b). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: II. Molecular-weight range. *Biotech. Bioeng.* **44**:529-532.
- Grimble G.K., Keohane P.P., Higgins B.E., Kaminski M.V. y Silk D.B.A. (1986). Effect of peptide chain length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the normal human jejunum. *Clinical Sci.* **71**:65-69.
- Guadix E.M.(1993). Hidrólisis enzimática de las proteínas del suero láctico. Ed. Ayala, Madrid, pp.36-38
- Guadix E.M., Camacho F., Bravo V. y Guadix A. (1998). Producción en reactores de membrana de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral. IV Congreso Internacional de Química de la ANQUE, p.168
- Haque Z.U. y Mozaffar Z. (1992). Casein hydrolysate. I. Continuous production using enzyme bioreactors. *Food Hydrocolloids.* **5**:549-557.
- Humbert G., Guingamp M.F., Kouomegne R. y Linden G. (1990). Measurement of proteolysis in milk and cheese using trinitrobenzene sulfonic acid and a new dissolving reagent. *J. Dairy Res.*, **57**:143-148.
- Hung N.D., Vas M., Cheke E. y Bolcsi S.Z.A. (1984). Relative tryptic digestion rates of food proteins. *J. Food Sci.*, **49**:1535-1542.
- 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 Européen A1 0 321 603*. Societé des produits Nestlé.
- Knights R.J. (1985). Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates. Nutrition for station needs in infancy protein hydrolysates. Ed. Fina Lisslhpz, Cap. 8, pp.105-115.

- Leaver J. y Thomson G. (1993). Influence of heating and cooling on the trypsinolysis of caseins in bovine milk. *Milchwiss.*, **48**:378-382.
- 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.
- Lemieux L. y Amiot J. (1989). Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. *J. Chromatogr.*, **73**:189-206.
- Lemieux L. y Amiot J. (1990). Efficiency of five chromatographic systems for the separation of casein digest. *J. Liq. Chromatogr.*, **13(20)**:4023-4035.
- Lind C.F. y Lee C.R. (1983). Process for the preparation of protein for hydrolysis. *Eur. Pat. Appl. 0,087,245* (to Stauffer Chemical Company, USA).
- 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.
- Margot A., Flaschel E. y Renken A. (1997). Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochem.*, **32(3)**:217-223.
- Margot A., Flaschel E. y Renken A. (1998). Development of a continuously operated reactor for the limited hydrolysis of whey protein by trypsin. *Process Biochem.*, **33**:125-131.
- Maubois J.L., Roger L., Brule G. y Piot M. (1981). Hydrolysat enzymatique total de proteines de lactoserum, obtention et applications. *Demande de Brevet Europeen A1 0 022 019*.
- Minagawa E., Kaminogawa S., Tsukasaki F. y Yamauchi K. (1989). Debitting mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by aminopeptidase T. *J. Food Sci.*, **54**:1225-1229.
- Moore S. y Stein W.H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **176**: 367-388.
- 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. *Biotech. Bioeng.*, **40**:195-206.
- Nakamura T., Sado H. Y Syukunobe Y. (1993). Production of low antigenic whey protein hydrolysates by enzymatic hydrolysis and denaturation with high pressure. *Milchwiss.*, **48(3)**:141-144.
- Nielsen P.M. y Hvass P. (1993). Whey protein hydrolyzate. *PTC Int. Appl. WO 93 24 020*.
- Novo Industrias. (1978). Anson hemoglobin method for determination of bacterial proteinase activity. *Información técnica Novo Industrias*.
- Otani H., Dong X.Y. y Hosono A. (1990). Preparation of low-immunogenic peptide fragments from milk casein. *Milchwissenschaft.*, **45(4)**:217-220.
- Parker D.M. y Pawlett D. (1987). Flavour control of protein hydrolysates. *European Patent Application A2 0 223 560*.
- Parrado J., Millan F, Hernandez-Pinzón I., Bautista J. y Machado A. (1993). Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, **41**:1821-1825.
- Pelissier J.P. (1984). Protéolyse des caséines. *Sci. Ali.*, **4**:1-35.
- Pellerin F., Baylocq D., Majcherczyk C. Y Hamon M. (1985). Fractionnement des proteines et de leurs hydrolysats par chromatographie d'exclusion sur gels sephadex. *Tech. Lait.*, 9-13.
- Perea A., Ugalde U., Rodriguez I. y Serra J.L. (1993). Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversions processes. *Enzyme Microb. Technol.*, **15**:418-423.
- Piske H. (1991). Improved protein hydrolyzate for use in patients with defective protein digestion. *Ger. (East) DD 294 852*.
- Piske H., Moewius A. y Roessler E. (1991). Improved protein hydrolyzate for use in patients with defective protein digestion. *Ger. (East) DD 294 851*.
- Postolache C. y Oncescu T. (1989). Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalyzed by alcalase. *Rev. Roumaine Chim.*, **34(2)**:581-584.
- Quaglia G.B. y Orban E. (1990). Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pichardus*) protein hydrolysates. *J. Food Sci.*, **55(6)**:1571-1573.
- Reid J.R., Coolbear T., Pillidge C.J. y Pritchard G.G. (1994) Specificity of hydrolysis of bovine k-casein by cell envelope-associated proteinases from *Lactococcus lactis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60(3)**:801-806.
- 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. *Meth. 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 A1 0 226 221*.
- Sarkki M.L. (1979). Food uses of wheat gluten. *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **56**: 443-446.
- 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.

- Steinhardt J. y Beychock S. (1964). Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules. *The proteins*, **II**:139-304.
- Takase M., Kawase K., Diyosowa I, Ogasa K, Susuki S. y Kuroume T. (1979). Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate. *J. Dairy Sci.*, **62**:1570-1576.
- Tayyab S. y Qamar S. (1992). A look into Enzyme Kinetics: Some Introductory Experiments. *Biochem. Education*, **20**(2):116-118.
- U.S.P. (United States Pharmacopea). (1989). XXII ed.
- Vallejo-Córdoba B., Nakai S., Powrie W.D. y Beveridge T. (1986). Protein hydrolysates for reducing water activity in meat products. *J. Food Sci.*, **51**:1156-1161.
- Valles E., Mourgues R., Vandeweghe J. y Thiebaud L. (1985). Une méthode rapide pour évaluer la protéolyse du lait causée par les bactéries psychrotrophes. *Techn. Lait.*, **1015**:33-43.
- Visser S., Slagen C.J. y Robben A.J.P.M. (1992). Determination of molecular mass distribution of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr.*, **599**:205-209.
- 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.
- Yvon M., Chabanet C. Y Pélissier J.P. (1989). Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions-hypothesis on the precipitation mechanism. *Int. J. Pep. Prot. Res.*, **34**:166-176.