

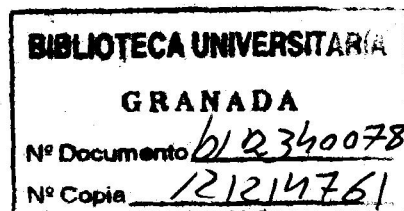
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Ingeniería Química

**HIDROLISIS ENZIMATICA
DE LAS PROTEINAS DEL SUERO LACTICO**

TESIS DOCTORAL



Emilia María Guadix Escobar
Granada, 1992

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Ingeniería Química

**HIDROLISIS ENZIMATICA
DE LAS PROTEINAS DEL SUERO LACTICO**

TESIS DOCTORAL

Emilia María Guadix Escobar
Granada, 1992

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Departamento de Ingeniería Química

Tesis Doctoral

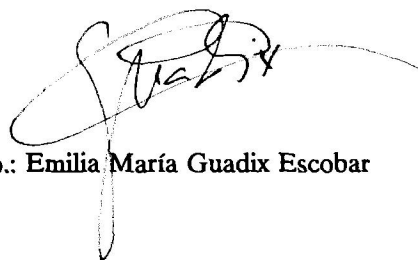
HIDROLISIS ENZIMÁTICA

DE LAS PROTEÍNAS DEL SUERO LÁCTICO

HIDROLISIS ENZIMATICA DE LAS PROTEINAS DEL SUERO LACTICO

Trabajo presentado para aspirar al grado de Doctor en Ciencias (Sección Químicas), dentro del Programa de Doctorado del Departamento de Ingeniería Química "Tecnología Bioquímica y Agroalimentaria" (Bienio 1988-90).

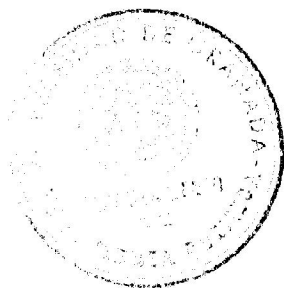
Granada, 15 de Mayo de 1992



Fdo.: Emilia María Guadix Escobar

VICENTE BRAVO RODRIGUEZ, Catedrático de Ingeniería Química y Director del Departamento del mismo nombre.

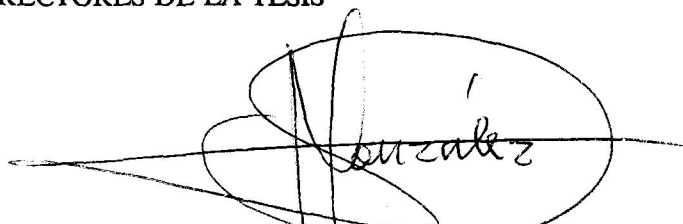
CERTIFICA: Que el presente trabajo sobre "Hidrólisis enzimática de las proteínas del suero láctico", ha sido realizado en los laboratorios de este Departamento bajo la dirección del Dr. D. Fernando Camacho Rubio y el Dr. D. Pedro González Tello, por la Licenciada D^a. Emilia María Guadix Escobar.



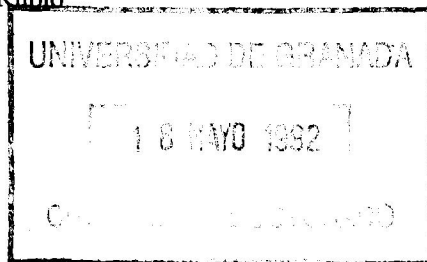
LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Dr. D. Fernando Camacho Rubio
Catedrático de Ingeniería
Química



Dr. D. Pedro González Tello
Catedrático de Ingeniería
Química



Mi más sincero agradecimiento

A D. Fernando Camacho Rubio y D. Pedro González Tello por su dirección, interés, ejemplo, enseñanzas y gran dedicación a todos los aspectos relacionados con este trabajo y con mi formación.

A D. Germán Luzón González por su ayuda inestimable en la realización de algunas figuras que aparecen en el presente Trabajo.

A todos los miembros del Departamento de Ingeniería Química que siempre estuvieron dispuestos a prestarme su colaboración y ayuda desinteresada y a todos los compañeros que pasaron por el Departamento con quienes compartí las horas de trabajo para la realización de esta Memoria.

Al Departamento de Investigación de U.N.I.A.S.A. y especialmente a D. Angel Gil, D. José Moreno Carretero y D. Julio Boza por su interés y colaboración en el desarrollo de este trabajo.

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	9
2.1 HIDROLIZADOS DE PROTEINAS	12
2.2 HIDROLISIS ENZIMATICA DE PROTEINAS	15
2.2.1 Sustratos utilizados	16
2.2.2 Proteasas de uso industrial	20
2.3 ESTUDIOS CINETICOS	22
2.4 PROCESOS PATENTADOS	26
2.5 OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION	29
3. MATERIALES Y METODOS	31
3.1 MATERIALES	33
3.1.1 Sustratos	33
3.1.2 Proteasas	33
3.2 METODOS	36
3.2.1 Determinación del contenido en proteína	36
3.2.2 Determinación de la actividad enzimática.	
Método modificado de Anson	36
3.2.3 Medida del grado de hidrólisis	39
3.2.3.1 Método del TNBS	39
3.2.3.2 Método del pH-estado	45
3.2.4 Distribución de tamaños moleculares	49
3.2.5 Medida de la alergenicidad: test - ELISA	54
3.3 DISPOSITIVO Y TECNICA EXPERIMENTAL	55
3.4 ULTRAFILTRACION DE LOS HIDROLIZADOS	56
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES	61
4.1 CINETICA DE LA HIDROLISIS	63
4.2 DISTRIBUCION DE TAMAÑOS MOLECULARES	84
4.3 OTROS EXPERIMENTOS	90
4.3.1 Influencia de la mezcla de enzimas	90
4.3.2 Influencia del pH	90
4.3.3 Influencia de la temperatura	90

5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS	97
5.1 CINETICA DE LA HIDROLISIS	99
5.1.1 Sistema Lactoalbúmina - Protease 660 L	99
5.1.2 Sistema Lactoalbúmina - Alcalasa 0.6 L	112
5.1.3 Sistema Lactoalbúmina - P.E.M. 2500 S	121
5.1.4 Comparación de los tres sistemas estudiados	135
5.2 DISTRIBUCION DE TAMAÑOS MOLECULARES	138
5.2.1 Sistema Lactoalbúmina - Alcalasa 0.6 L	138
5.2.2 Sistema Lactoalbúmina - Protease 660 L	141
5.2.3 Sistema Lactoalbúmina - P.E.M. 2500 S	143
5.2.4 Comparación entre los tres sistemas estudiados	146
5.3 MODELO CINETICO PROPUESTO	147
5.4 APLICACION AL ANALISIS DE LA INFLUENCIA DE OTRAS VARIABLES DE OPERACION	153
5.4.1 Utilización de mezclas de proteasas comerciales	154
5.4.2 Influencia del pH	157
5.4.3 Influencia de la temperatura	160
6. CONCLUSIONES	163
7. NOMENCLATURA	169
8. BIBLIOGRAFIA	175
9. APENDICE	183
9.1 AJUSTE CON FUNCIONES SPLINE CUBICAS	185
9.2 METODO DIFERENCIAL	204
9.3 METODO INTEGRAL	218
9.4 VALORES RECALCULADOS	234

1. RESUMEN

Los hidrolizados de proteínas se utilizan ampliamente como saborizantes de alimentos, para la preparación de bebidas estimulantes y en general como componentes importantes de alimentos preparados; aunque últimamente se está prestando gran atención a su producción con vistas a la preparación de "dietas especiales" para nutrición enteral de lactantes y adultos enfermos, fundamentalmente a partir de proteínas lácteas.

Las dietas entéricas están diseñadas para ser absorbidas en los intestinos, sin una digestión previa en el estómago; son necesarias para tratar un gran número de enfermedades y trastornos estomacales. Una dieta entérica completa debe contener aminoácidos, aunque no necesariamente libres. Existe suficiente evidencia experimental que indica que los péptidos de 2 a 3 restos aminoácidos son absorbidos en muchos casos más fácilmente que los aminoácidos individuales, evitando parcial o totalmente la competencia que tiene lugar entre aminoácidos que comparten el mismo mecanismo de transporte.

También se conoce que las dietas de pequeños péptidos pueden ser útiles en el tratamiento de trastornos en la absorción de aminoácidos. De hecho, no hay evidencia de deficiencias en el transporte de péptidos análogas a las conocidas en el transporte de aminoácidos. Por otra parte, las dietas de aminoácidos libres son hiperosmóticas comparadas con las dietas de péptidos y pueden provocar secreción intestinal con efectos diarreicos.

Las proteínas y péptidos de elevado peso molecular son frecuentemente alergénicos y por tanto inutilizables para la preparación de dietas especiales; si bien este efecto parece desaparecer prácticamente para pesos moleculares inferiores a 5000 - 2000 Da según diferentes autores.

El sabor de los hidrolizados de proteínas es otra característica importante para el éxito de una dieta especial, ya que durante el proceso de hidrólisis pueden formarse péptidos de intenso sabor amargo que provocarían el rechazo de estas dietas por los pacientes. El amargor se cree que está relacionado con la hidrofobicidad de las cadenas laterales de los aminoácidos y suele ser debido a péptidos relativamente pequeños, pesos moleculares de 1000 a 6000 Da.

En resumen, los hidrolizados de proteínas para la preparación de dietas especiales deben poseer una distribución de pesos moleculares lo más estrecha posible, con un alto contenido en di- y tripéptidos, peso molecular medio del orden de 500 y no contener péptidos de peso molecular superior a 1000,

ya que de esta forma desaparecen los problemas de amargor, hiperosmoticidad y alergenicidad. Además, su valor biológico debe ser lo más próximo al de la proteína de partida y su contenido salino limitado.

El trabajo que se describe en esta Memoria forma parte de una línea de investigación sobre el desarrollo de un proceso de hidrólisis enzimática de proteínas lácteas por el Grupo de Biorreactores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada en colaboración con el Departamento de I+D de Unión Industrial y Agroganadera S.A. (U.N.I.A.S.A.) en el marco de un Proyecto concertado CDTI - UNIASA.

En concreto, en este trabajo se ha estudiado la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero, lactoalbúmina comercial, exenta de lactosa, con un 73 % en peso de proteína y un 6 % de humedad. Las enzimas seleccionadas han sido las siguientes proteasas comerciales de grado alimentario: MKC Protease 660 L, fabricada por los Laboratorios Miles por fermentación de *Bacillus subtilis*, cuya actividad resultó ser de 6.6 UA/mL; Alcalasa 0.6 L, fabricada por NOVO Industrias por fermentación de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*, con una actividad de 1.01 UA/g, y P.E.M. 2500 S, también de NOVO Industrias, que es una mezcla de enzimas pancreáticas de origen bovino y porcino, con una actividad de 20.84 UA/g.

El estudio cinético de la hidrólisis se ha llevado a cabo mediante las siguientes técnicas y dispositivos experimentales:

Medida de la actividad enzimática

Se ha utilizado el método modificado de Anson, en este ensayo normalizado se hidroliza hemoglobina desnaturalizada a pH=7.5 y 25°C durante 10 minutos, se precipita la hemoglobina no hidrolizada con ácido tricloroacético y al sobrenadante filtrado se le añade un reactivo de carácter fenólico que produce un color azul con tirosina y triptófano, midiéndose la absorbancia a 750 nm. Para obtener la línea de calibrado se utiliza una proteasa de actividad Anson conocida, en este caso tripsina pancreática.

Medida del grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis se determinó de dos formas complementarias: por el consumo de base necesario para mantener constante el pH durante la hidrólisis y mediante el método del TNBS, que se basa en la reacción de trinitrofenilación entre grupos aminos libres y el ácido 2,4,6 trinitrobenzenosulfónico que conduce a productos coloreados, midiéndose la absorbancia a 420 nm. El método requiere un calibrado previo que se realiza con aminoácidos libres u oligopéptidos.

Medida de la distribución de pesos moleculares

Se realiza mediante HPLC con columnas de TSK-gel que conduce a una buena separación de péptidos por tamaño molecular y a una correlación entre el logaritmo del peso molecular y el tiempo de retención. Esta correlación se determina previamente mediante péptidos de referencia de tamaño molecular conocido en el intervalo de 200 - 50000 Da.

Reactor de hidrólisis

Constituido por un tanque agitado de operación discontinua, con control de temperatura, pH y toma de muestras.

Unidad de ultrafiltración

Sistema de ultrafiltración de flujo tangencial, área de filtración de 0.1 a 0.7 m², presión de 0.5 a 5 bar, con membranas de peso molecular de corte 10000, 5000 y 1000 Da.

La mayor parte de los experimentos cinéticos se realizaron en las condiciones de mayor actividad - estabilidad de las enzimas seleccionadas de acuerdo con la información suministrada por los fabricantes, 50°C y pH=8.0; aunque también se realizaron algunos experimentos exploratorios a mayores temperaturas y pHs más alcalinos. Se ha estudiado la acción de las tres proteasas comerciales sobre el sustrato de forma independiente, aunque también se realizaron algunos experimentos con mezclas de proteasas bacterianas y de origen animal.

En cada sistema el grado de hidrólisis conseguido depende de las concentraciones iniciales de sustrato y enzima y del tiempo de operación, que fueron las variables analizadas en el estudio cinético.

Para el tratamiento de los resultados primarios se han seguido dos métodos complementarios:

Método diferencial

Se han ajustado los resultados experimentales mediante funciones spline cúbicas y a partir de ellas se han determinado las velocidades de hidrólisis para diferentes grados de hidrólisis con objeto de determinar la relación funcional que existe entre ellas.

Método integral

Por integración analítica o numérica de las relaciones anteriores se han determinado los mejores valores de los parámetros cinéticos por regresión no lineal mediante el algoritmo de Marquardt.

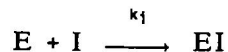
Se ha encontrado que en todos los sistemas analizados la cinética de la hidrólisis de lactoalbúmina comercial se ajusta a la ecuación de velocidad

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = \beta (e_0 - e \cdot s_0) \exp(-\gamma \cdot x)$$

donde el término sustractivo del binomio del segundo miembro se ha explicado admitiendo la existencia en el sustrato de un inhibidor irreversible de serina - proteinasas, que ha sido encontrado recientemente en el suero láctico por Weber y Nielsen; este inhibidor actúa asociándose irreversiblemente a una fracción de la enzima activa en tiempos muy cortos comparados con los necesarios para la hidrólisis.

Esta ecuación cinética es compatible con el siguiente mecanismo propuesto

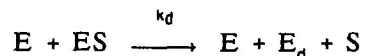
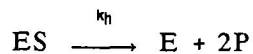
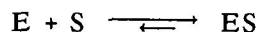
a) Un proceso muy rápido de unión irreversible de la enzima activa al inhibidor presente en el sustrato



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

$$e_{0a} = e_0 - e \cdot s_0$$

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



y se han determinado los parámetros cinéticos: e , k_h y k_d para las tres proteasas comerciales utilizadas y para las mezclas de proteasas de origen bacteriano y animal.

Las proteasas bacterianas han resultado ser más eficaces que las proteasas pancreáticas, particularmente la Alcalasa 0.6 L.

En la utilización simultánea de proteasas de origen bacteriano y animal se aprecia una desnaturalización parcial entre ambas en los primeros instantes y un efecto sinérgico importante que llega a predominar sobre la desnaturalización inicial para grados de hidrólisis elevados.

El análisis de la distribución de pesos moleculares pone de manifiesto que para cada sistema depende exclusivamente del grado de hidrólisis alcanzado. En cada sistema una fracción de la seroalbúmina presente en el sustrato, del 1 al 3 % de éste, resulta resistente a la hidrólisis; aunque esta fracción disminuye cuando se emplean mezclas de proteasas de origen bacteriano y animal.

Los otros dos componentes principales del sustrato: β -globulina y α -lactoalbúmina, así como los péptidos intermedios, peso molecular superior a 3000 Da, desaparecen por completo para grados de hidrólisis del 15 % con las proteasas bacterianas y del 10 % con las proteasas de origen animal.

A partir del 15 % de hidrólisis no existe diferencia aparente entre los hidrolizados obtenidos con proteasas de origen bacteriano o animal. La fracción de peso molecular comprendido entre 1000 y 3000 Da va disminuyendo continuamente y aumentando la fracción de péptidos de tamaño molecular inferior a 1000 Da. Para grados de hidrólisis superiores al 20 %, más del 95 % del hidrolizado está formado por péptidos de tamaño inferior a 1000 Da.

La expresión integrada de la ecuación de velocidad

$$x = \frac{k_n}{k_d} \ln \left[1 + k_d \left(\frac{e_0}{s_0} - e \right) \cdot t \right]$$

pone de manifiesto que la variable intensiva del tratamiento enzimático es

$$\left(\frac{e_0}{s_0} - e \right) \cdot t$$

expresión que permite optimizar las condiciones de operación: e_0 , s_0 y t necesarias para obtener un determinado grado de hidrólisis.

El aumento del pH por encima de 8.0 parece favorecer la hidrólisis en la actuación de Protease 660 L, aunque esto determinará un aumento de la concentración salina del hidrolizado final. Si bien en este último aspecto debe tenerse presente que para mantener constante el pH durante la hidrólisis y para la neutralización final puede utilizarse una base que suministre ya algunos iones necesarios en la dieta especial para la que se van a utilizar los hidrolizados de proteínas, generalmente una mezcla de KOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

El aumento de la temperatura por encima de 50°C también favorece la hidrólisis en la actuación de Protease 660 L, alcanzándose un óptimo alrededor de 60°C.

2. INTRODUCCION

La hidrólisis enzimática de los biopolímeros contenidos en los alimentos: polisacáridos y proteínas tiene como objetivo mejorar las características físicas, químicas y organolépticas del alimento original y aumentar su digestibilidad sin detrimento de su valor nutritivo. En este sentido estos procesos son cada vez más utilizados en la Industria Agroalimentaria para la fabricación de alimentos preparados, productos dietéticos y de dietas especiales para alimentación de lactantes y adultos enfermos.

La hidrólisis enzimática presenta indudables ventajas frente al tradicional método químico: ácido o alcalino, entre las que cabe destacar las siguientes

Selectividad: las enzimas suelen ser 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 irremediamente a la existencia de productos de degradación, que incluso pueden llegar a ser tóxicos.

Condiciones moderadas de temperatura y pH: la hidrólisis enzimática transcurre a temperaturas próximas a la ambiente, 40°- 60° C, y pHs comprendidos entre 5-8.

No se añaden sustancias extrañas: evidentemente este hecho no sucede en los procesos de hidrólisis ácida y alcalina, ya que en ambos casos la neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales. Esto suele ser un grave inconveniente sobre todo si el hidrolizado se va a destinar a la preparación de alimentos infantiles, dietéticos o para adultos enfermos.

Los procesos más interesantes desde un punto de vista económico son la hidrólisis enzimática del almidón de harina de cereales, de las pectinas y celulosa presentes en los zumos de frutas, de la lactosa de la leche o del lactosuero y de las proteínas.

Así, los jarabes de dextrinas, glucosa y sobre todo fructosa son ampliamente utilizados en pastelería y para la fabricación de papillas. Estos jarabes se obtienen por hidrólisis del almidón extraído de cereales, algunos tubérculos y leguminosas. También la hidrólisis parcial de harina de cereales con alto contenido en almidón se utiliza para la preparación de alimentos infantiles: papillas lacteadas. En este caso uno de los factores más importantes a considerar es la distribución de tamaños moleculares obtenida en la hidrólisis que determina la digestibilidad y las características reológicas y de textura de las papillas.

Las pectinas y celulosa son los constituyentes mayoritarios de la pared celular de frutos y legumbres. Desde un punto de vista químico las pectinas son heteropolisacáridos constituidos por cadenas de ácido D-galacturónico, a las que se encuentran unidos distintos carbohidratos, galactosa, arabinosa y xilosa, principalmente. La celulosa está constituida por cadenas lineales de glucosa. En ambos casos, un tratamiento con pectinasas y celulasas conduce a un mayor rendimiento de la extracción y los zumos obtenidos se clarifican y estabilizan más fácilmente.

La lactosa es el principal hidrato de carbono de la leche y del lactosuero; es un dímero formado por una molécula de glucosa y otra de galactosa. Su hidrólisis es interesante por las ventajas nutricionales, tecnológicas y medioambientales que proporciona. Respecto del primer punto, los problemas de intolerancia a la lactosa que presenta una gran parte de la población humana no blanca y entre un 2-15 % de los blancos, se eliminan mediante la hidrólisis de la lactosa. En todo caso, es un paso obligado para preparar dietas especiales. Además del problema de intolerancia ya comentado, la presencia de lactosa, tanto en la leche como en el lactosuero, causa dificultades importantes en la producción de leches concentradas en polvo, debido a su tendencia a cristalizar. Desde un punto de vista medioambiental, es conveniente realizar la hidrólisis de la lactosa en vertidos de queserías y lecherías, para facilitar su eliminación, ya que tanto la glucosa como la galactosa son más fácilmente fermentables por microorganismos. De todas formas, la lactosa es un sacárido de débil poder edulcorante, 20 % del correspondiente a la sacarosa, por tanto su hidrólisis también aumenta esta característica, por lo que se disminuye la adición de sacarosa a los preparados lácteos.

2.1 HIDROLIZADOS DE PROTEINAS

Los hidrolizados de proteínas se utilizan fundamentalmente como saborizantes de alimentos, como suplementos en algunas bebidas y refrescos y para la preparación de dietas especiales para lactantes y adultos enfermos.

En este caso la competencia entre los procesos químicos y enzimáticos es aún más clara a favor de estos últimos, ya que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y no produce sabores adecuados y la hidrólisis ácida destruye por completo el triptófano y desamina parcialmente los aminoácidos serina y treonina. Si en este último proceso se utiliza ácido sulfúrico y la neutralización se realiza con hidróxido cálcico puede obtenerse un producto libre de sales, tras la separación por filtración del sulfato cálcico producido, pero de sabor áspero; si se utiliza ácido clorhídrico, la neutralización posterior determina un alto contenido salino del producto final, como ya se ha indicado anteriormente. No obstante si esta neutralización conduce a cloruro sódico, como es usual, y el producto

final se va a emplear como saborizante, este proceso es adecuado por sus altos rendimientos y costes relativamente bajos.

Hoy día es evidente que cuando se pretende utilizar los hidrolizados por su valor nutritivo y sobre todo en la preparación de dietas para nutrición enteral, el contenido salino debe estar limitado y debe respetarse al máximo la estructura de los componentes de la proteína por separado, no sólo para mantener su valor biológico sino también para evitar la contaminación de los hidrolizados obtenidos por los productos de degradación de estos componentes, de ahí la necesidad de recurrir a la hidrólisis enzimática; de hecho todos los procesos comerciales y las patentes registradas con esta finalidad utilizan este tipo de hidrólisis.

Las dietas entéricas están diseñadas para ser absorbidas en los intestinos, sin una digestión previa en el estómago; son necesarias para paliar un gran número de enfermedades y desórdenes estomacales. Estas dietas deben contener aminoácidos para suministrar una nutrición completa, pero no es necesario, ni conveniente, que 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 la velocidad de absorción es menor para los aminoácidos libres que para péptidos pequeños, ya que la adsorción de di y tripéptidos evita parcial o totalmente la competencia que tiene lugar entre aminoácidos que comparten el mismo mecanismo de transporte, Grimble *et al.* (1986 y 1897). Además estos pequeños péptidos pueden pasar al interior de la célula donde son hidrolizados a aminoácidos y estudios experimentales en ratas demuestran que la administración endovenosa de los mismos es tan efectiva como la de los correspondientes aminoácidos en lo que se refiere a su incorporación tisular, Takase *et al.* (1979).

En efecto, hoy día es conocido que la dietas ricas en pequeños péptidos, pueden ser útiles para el tratamiento de los trastornos o disfunciones de la absorción de aminoácidos, como la enfermedad de Hartnupp (disminución del transporte de aminoácidos neutros), la cistinuria (dificultad para la absorción de cisteína, arginina y lisina) y el síndrome de Lowe provocado por una disminución de la velocidad de absorción de todos los aminoácidos. De hecho, no existe evidencia de una disminución en el transporte de péptidos pequeños, a través de la membrana intestinal, semejante a las conocidas para los aminoácidos.

Las proteínas y péptidos de elevado peso molecular son frecuentemente alergénicos y por tanto inutilizables para la preparación de dietas especiales, Coombs y McLaughlan (1984). Este efecto desaparece prácticamente para pesos moleculares inferiores a 6000, Tossavainem *et al.* (1983) y Samuelsson y Poulsen (1987). sin embargo otros autores sitúan este límite en pesos moleculares más

pequeños, así Otani *et al.* (1990) propone 3500 Da e incluso Knights (1987) recomienda que los péptidos no sean superiores a 1200 Da. Con respecto a la alergenicidad de los péptidos obtenidos en la hidrólisis enzimática, algunos autores consideran que un tratamiento semejante al que tiene lugar en el aparato digestivo del hombre, es lo más idóneo para conseguir hidrolizados hipoalergénicos, es decir un tratamiento con pepsina seguido de un tratamiento con quimiotripsina, tripsina o una mezcla de ambas, Asselin *et al.* (1989), Otani *et al.* (1990).

También algunos investigadores señalan que la alergenicidad puede estar provocada por los productos de las reacciones de Maillard originados en los pretratamientos térmicos necesarios para llevar la hidrólisis enzimática a las altas conversiones requeridas con vistas a obtener hidrolizados hipoalergénicos, De Rham (1989) y Jost *et al.* (1989).

El sabor de un hidrolizado de proteínas es también un factor importante para el éxito de una dieta entérica, y éste puede depender de la proteína utilizada y del grado de hidrólisis alcanzado. Así las legumbres conducen a hidrolizados de intenso sabor amargo que contienen compuestos tales como alcoholes, cetonas y aldehídos de cadena larga que les dan un sabor desagradable. Los concentrados de proteína de pescado están usualmente contaminados con aminas que le dan su sabor característico y además contienen grasas insaturadas difíciles de separar. Por ello, la materia prima ideal para la preparación de dietas entéricas parecen ser las proteínas lácteas, tanto por su composición en aminoácidos como por los sabores que pueden conseguirse mediante una hidrólisis suficientemente intensa, Chiang *et al.* (1982). No obstante, el amargor de los péptidos y su alergenicidad, parecen estar más relacionados con el método de hidrólisis y la distribución de pesos moleculares alcanzada, que con el origen de la proteína de partida.

El amargor se cree que está relacionado con la hidrofobicidad de las cadenas laterales de los aminoácidos y suele ser debido a péptidos relativamente pequeños, pesos moleculares comprendidos entre 1000 y 6000, Ney (1979) y Otagiri *et al.* (1983). Para eliminar péptidos amargos, se pueden utilizar procesos de adsorción sobre carbón activo, Cogan *et al.* (1981) o extracción con 2-butanol, Lalasidis y Sjoberg (1978), pero esto conlleva la pérdida selectiva de determinados aminoácidos y por tanto de valor biológico de los hidrolizados obtenidos. Otros procedimientos consisten en realizar la hidrólisis en presencia de un carbohidrato, Suzuki *et al.* (1981) y Sprössler y Uhling (1981), pero esto supone introducir nuevos componentes, que pueden no ser convenientes para la preparación de dietas especiales. También es frecuente encontrar referencias con respecto a la eliminación de péptidos amargos mediante un tratamiento con exopeptidasas, lo que confirma que por debajo de un determinado tamaño molecular, el amargor desaparece y sugiere que éste puede estar provocado, fundamentalmente,

por aminoácidos hidrofóbicos en posiciones terminal o próximas, Umetsu *et al.* (1983), Parker y Pawlett (1987) y Minagama *et al.* (1989).

En resumen, los hidrolizados de proteínas para la preparación de dietas especiales, deben poseer una distribución de pesos moleculares lo más estrecha posible, con un alto contenido en di y tripéptidos, y peso molecular medio del orden de 500, ya que de esta forma desaparecen los problemas de amargor, hiperosmotividad y no son alergénicos.

2.2 HIDROLISIS ENZIMATICA DE PROTEINAS

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

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

clasificación que se basa fundamentalmente en la solubilidad de las macromoléculas y que de manera aproximada se corresponde con los pesos moleculares medios, MW, y con la relación nitrógeno amino - nitrógeno total, AN/TN, que se indica en la siguiente tabla

	MW	AN/TN
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

No obstante la hidrólisis enzimática de proteínas plantea algunos problemas importantes:

Resistencia a la hidrólisis: las proteínas nativas globulares son generalmente resistentes a la hidrólisis enzimática por su estructura terciaria compacta que protege la mayor parte de los enlaces peptídicos. Por esta razón, la velocidad de hidrólisis puede incrementarse de manera apreciable mediante un pretratamiento de la proteína que provoque su desnaturalización parcial; dada la necesidad

de no introducir en los hidrolizados sustancias solubles ajenas a ellos, los pretratamientos sólo podrán consistir en tratamientos térmicos o cambios ligeros de pH.

Contaminación microbiana: dado que la hidrólisis enzimática de las proteínas es un proceso relativamente lento, cuya velocidad disminuye de forma apreciable cuando se alcanzan grados de hidrólisis importantes, y la imposibilidad de llevar a cabo un tratamiento térmico intenso para la esterilización total de las disoluciones o suspensiones de sustratos por su labilidad térmica, la contaminación microbiana de la mezcla reaccionante constituye generalmente un problema importante.

Especificidad de las enzimas: las enzimas proteolíticas corresponden a dos grandes clases: las peptidasas, que separan aminoácidos o dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas (EC 3.4.11 a 3.4.17), también llamadas exopeptidasas y las proteinasas que rompen enlaces peptídicos del interior de las cadenas (EC 3.4.21 a 3.4.24), también llamadas endopeptidasas. Estas enzimas suelen ser específicas para determinados enlaces peptídicos, por lo que es generalmente necesario utilizar combinaciones de las mismas para alcanzar altos grados de hidrólisis; incluso aunque se empleen preparados comerciales que son mezclas de diferentes enzimas, para alcanzar los pesos moleculares indicados anteriormente, puede ser necesario usar combinaciones de los mismos.

2.2.1 Sustratos utilizados

Aunque los concentrados proteicos de soja se emplean para obtención de hidrolizados de proteínas con vistas a su aplicación como saborizantes y complementos nutritivos para bebidas y refrescos, cuando la finalidad deseada es la preparación de dietas especiales, los sustratos utilizados son siempre las proteínas lácteas: lactoalbúmina y caseína.

Ambas proteínas poseen un gran valor biológico, entendiéndose por tal la proporción de ellas que el organismo humano o animal puede utilizar para la síntesis de las suyas propias. En las tablas 2.1, 2.2 y 2.3 se indica la distribución media de las proteínas de la leche, sus características y su composición en aminoácidos respectivamente.

La caseína es el componente principal de la proteína láctea, aproximadamente el 80%, y se obtiene por precipitación de la leche desnatada, por efecto combinado de un ácido: ClH , SO_4H_2 ó ácido láctico y la temperatura. Después de separar el suero y secar se obtiene un sólido blanco con más de un 80% en proteína.

Tabla 2.1
Distribución media de las proteínas de la leche. Veisseyre (1980)

Proteína	% sobre proteínas totales	g/L de leche
Caseína	80	26
Proteínas del suero láctico	17	5.2
Albúminas	15	0.7
Inmunoglobulinas	2	4.5
Proteosas-peptonas	2	0.5
Proteínas menores	1	0.3

Tabla 2.2
Algunas características de caseínas y albúminas de la leche. Adaptada de Veisseyre (1980)

Proteína	Peso Molecular	pH isoelectrico	% sobre total de aminoácidos	Restos aminoácidos
Caseínas				
Caseína α	24000	4.1	Mayoritario	199
Caseína β	24000	4.5	-	209
Caseína γ	19-23000	3.7	-	169
Albúminas				
α -lactoalbúmina	16300	5.1	25	123
β -lactoglobulina	18000	5.2	60	162
seroalbúmina	65000	4.7	-	-

Tabla 2.3
Composición en aminoácidos de las proteínas de la leche (% en materia seca)

Aminoácidos	Componentes de la leche de vaca						
	Caseínas				β-lactoglobulina		α-lactoalbúmina
	αs	β	κ	γ	A	B	
Acido aspártico	7.59	4.9	7.30	4.0	11.39	10.72	18.65
Treonina	3.0	5.1	6.64	4.4	5.01	4.79	5.50
Serina	5.8	6.8	6.09	5.5	3.58	3.31	4.76
Acido glutámico	20.9	23.2	17.35	22.9	19.12	19.05	12.85
Prolina	7.8	16.0	8.78	17.0	5.22	5.08	1.98
Glicina	2.37	2.4	1.31	1.5	1.24	1.55	3.21
Alanina	3.18	1.7	5.41	2.3	6.7	7.03	2.14
Cistina (1/2)	0.2	0	2.8	0	3.4	3.4	6.4
Valina	5.36	10.2	5.1	10.5	6.11	5.72	4.66
Metionina	2.44	3.4	1.0	4.1	3.16	3.15	0.95
Isoleucina	5.16	5.5	6.14	4.4	6.76	6.79	6.80
Leucina	8.65	11.6	6.08	12.0	15.08	14.96	11.52
Tirosina	7.11	3.2	7.40	3.7	3.87	3.79	5.37
Fenilalanina	5.06	5.8	4.07	5.8	3.53	3.49	4.47
Triptófano	2.13	0.83	1.05	1.2	2.62	2.62	7.0
Lisina	8.56	6.5	5.76	6.2	11.93	11.62	11.47
Histidina	2.70	3.1	1.67	3.7	1.63	1.59	2.85
Arginina	3.74	3.4	4.0	1.9	2.78	2.69	1.15

El lactosuero es el líquido resultante de la coagulación de la leche en la fabricación del queso tras la separación de la caseína y de la grasa. Según el procedimiento empleado para separar la caseína, por acción del cuajo o de ácidos, se distinguen el suero dulce (suero por coagulación) que no contiene lactato cálcico, y el suero ácido (suero por acidificación) que contiene esta sustancia. Como se puede observar en la tabla 2.4, la composición del suero varía sensiblemente dependiendo de la forma utilizada para obtenerlo.

Tabla 2.4
Composición del lactosuero, E. Spreer *et al.* (1973)

	Lactosuero dulce	Lactosuero ácido
Agua	93 - 94 %	94 - 95 %
Extracto seco	6 - 7 %	5 - 6 %
Lactosa	4.5 - 5 %	3.8 - 4.2 %
Acido láctico	Vestigios	Hasta el 0.8 %
Proteínas	0.8 - 1 %	0.8 - 1 %
Acido cítrico	0.1 %	0.1 %
Cenizas	0.5 - 0.7 %	0.7 - 0.8 %
pH	6.45	Alrededor de 5

Por tanto, el lactosuero es un subproducto integrado por valiosas materias, cuya obtención y oportuno aprovechamiento revisten una gran importancia económica. Además, debido a la alta D.B.O. de estos vertidos es conveniente su recuperación, E. Spreer *et al.* (1973). Como se observa en la tabla 2.4, en el suero existe un promedio del 0.8% de proteínas (albúmina, globulina), así como productos del desdoblamiento de la caseína.

Las proteínas del lactosuero se suelen recuperar mediante ultrafiltración o realizando una precipitación por acción combinada del pH y la temperatura. Calentando el lactosuero a 90-95°C coagulan las proteínas, pero para conseguir la máxima recuperación se debe ajustar el pH a un valor comprendido entre 4.4 y 4.8 antes o durante el calentamiento (punto isoeléctrico de las proteínas de la leche pH = 4.65). De esta manera se consiguen rendimientos de 4 a 5 Kg. de proteínas por cada 1000 L de suero.

La precipitación se realiza en recipientes o tanques de acero inoxidable o esmaltado. El calentamiento tiene efecto por medio de serpentines recorridos por vapor o bien mediante la inyección directa de éste. El suero calentado a 90-95°C se mantiene durante 30-50 min a esas temperaturas. Después se decanta, si es necesario se filtra o se centrifuga y seguidamente se prosigue su transformación industrial. En la tabla 2.5 se indican las características del precipitado. Este producto una vez deshidratado y molido es lo que se conoce como LACTOALBUMINA COMERCIAL.

Tabla 2.5

Composición y características del precipitado primario del lactosuero, E. Spreer *et al.* (1973)

Extracto seco (mínimo)	20 %
Agua (máximo)	80 %
Aspecto, color	De blanco grisáceo a amarillento
Olor	Puro, un poco a leche ácida
Sabor	Puro, neutro o débilmente ácido
Consistencia	Pastosa

2.2.2 Proteasas de uso industrial

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas fueron proteasas de origen animal (tripsina, pepsina, quimotripsina, renina, etc) y vegetal, como la papaína. Actualmente las proteasas obtenidas por fermentación de microorganismos son las más utilizadas de forma que una de las industrias biotecnológicas más prósperas es la producción de proteasas a partir de *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Aspergillus*, *Streptomyces*, etc. La mayor parte de las proteasas comerciales se dedican a la producción de detergentes y para algunas aplicaciones en la Industria Agroalimentaria, Aunstrup (1977), Ducroo (1982). En la tabla 2.6 se muestra la importancia relativa de las proteasas en el mercado mundial de enzimas.

Las proteasas se clasifican en cuanto su acción hidrolítica en endopeptidasas si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas y exopeptidasas si separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas polipeptídicas. En la tabla 2.7 se muestra una clasificación atendiendo a estas características y en la tabla 2.8 algunas de las proteasas comerciales más utilizadas.

Tabla 2.6
Distribución del mercado mundial de enzimas, Ducroo (1982)

Enzima	%
Proteasas bacterianas	35
Amiloglucosidasa	13
Glucosaisomerasa	12
Amilasas bacterianas	10
Pectinasas	9
Enzimas coagulantes de la leche	9
Amilasas fúngicas	3
Proteasas fúngicas	2
Otras	7

Tabla 2.7
Clasificación de las proteasas, Driou *et al.* (1985)

ENDOPEPTIDASAS (PROTEINASAS)	EXOPEPTIDASAS (PEPTIDASAS)
Serina-proteinasas (tripsina, quimiotripsina...)	Aminopeptidasas
SH-proteinasas (papaína, bromelina...)	Carboxipeptidasas
Aspartato proteinasas (pepsina, quimosina...)	Dipeptidasas
Metaloproteinasas (colagenasa, termolisina...)	
Proteinasas diversas (renina, queratinasa...)	

Tabla 2.8
Características de algunas proteasas comerciales.

Enzima	Origen	Estabilidad	
		pH	T, °C
Alcalasa 0.6 L	<i>B. licheniformis</i>	4 < pH < 11.5	50 < T < 60
Neutrasa	<i>B. subtilis</i>	6 < pH < 8	40 < T < 50
Protease 660 L	<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
	quimotripsina bov.		
Corolase PP	trip. y quimotrip.	5 < pH < 10.5	35 < T < 60
Corolase PS	<i>Aspergillus</i>	4.5 < pH < 5	30 < T < 55
Corolase 7092	<i>Aspergillus</i>	6 < pH < 11	35 < T < 55

2.3 ESTUDIOS CINETICOS

Los trabajos publicados sobre el mecanismo y cinética de la hidrólisis enzimática de proteínas son escasos debido a dos razones: la complejidad del proceso considerado y su importancia económica, que determinan un mayor interés por el desarrollo y patente de procesos comerciales.

Jost y Monti (1977), estudian la hidrólisis enzimática parcial de proteínas del lactosuero, con y sin separación de la lactosa, por tripsina porcina. Sin embargo, sólo realizan tres experimentos cinéticos, que no interpretan, estableciendo las condiciones óptimas de la reacción en pH=8.0 y 55°C. La enzima utilizada es tripsina cristalina NOVO 4500 K, con 25 UA/g y una relación enzima/sustrato de 1/100 en peso. En las condiciones indicadas se alcanza un grado de hidrólisis del 8 % en 3 horas, liberándose 500 μ moles de protones valorables por gramo de sustrato. El hidrolizado obtenido está formado mayoritariamente por péptidos de 500 a 5000 Da, junto con una pequeña proporción de aminoácidos libres, fundamentalmente lisina y arginina.

Camus *et al.* (1980), estudian comparativamente la hidrólisis de caseína y gluten de trigo por enzimas pancreáticas: tripsina y quimotripsina. Estos autores siguen 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 interpretan cinéticamente sus resultados, sino que sólo comparan 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 enzima-sustrato utilizada.

Constantínides y Adu-Amankwa (1980), analizan 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 30-55°C y pH=3.4-3.7. Estos autores proponen un mecanismo de solubilización que implica la adsorción de la enzima a la proteína insoluble, inhibición por los péptidos de bajo peso molecular y desactivación enzimática; derivan así unas ecuaciones cinéticas globalizadas semiempíricas de 4-5 parámetros, cuyos valores determinan por regresión no lineal aplicando el algoritmo de Marquardt. Posteriormente, estos mismos autores con la colaboración de Vieth (1981) inmovilizan la enzima sobre colágeno reconstituido, lo que permite incrementar la productividad por unidad de masa de enzima activa por un factor de 4.5.

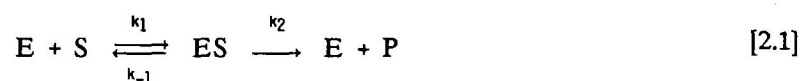
Akuzawa *et al.* (1985) han estudiado la hidrólisis de diferentes tipos de caseína (α , β , κ) y de caseína entera con una proteinasa de *Streptococcus lactis*, siguiendo el curso de la reacción por la concentración de tirosina liberada y por electroforesis en gel de poliacrilamida. Estos autores ajustan sus datos de velocidad inicial a una cinética de Michaelis-Menten, si bien el número de experimentos realizado es relativamente pequeño.

Herbert y Dunnill (1988) comparan 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 la electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico para establecer la distribución de pesos moleculares del hidrolizado obtenido. Aunque analizan la variación con el tiempo de las fracciones de péptidos de diferentes pesos moleculares, tanto para la enzima soluble como inmovilizada, no abordan una interpretación cinética de sus resultados.

Chobert *et al.* (1988) estudian la solubilidad y propiedades emulsificantes de caseína y proteínas del lactosuero parcialmente hidrolizadas con tripsina. En el caso de la caseína se analizan las características de los hidrolizados de grados de hidrólisis de 4.3; 8.0 y 9.9, determinados por el método del TNBS, en los tres casos los pesos moleculares de los péptidos resultantes son menores de 15000 Da y para el hidrolizado del 9.9 de grado de hidrólisis el 99 % tiene un peso molecular inferior a 5000 Da y el 66%

inferior a 1000 Da. Para los hidrolizados de las proteínas del lactosuero, el correspondiente al 2.5 % de hidrólisis está formado fundamentalmente por péptidos de 18000, 13000, 9000 y 5000 Da; el correspondiente al 3.9 % de hidrólisis, por péptidos de 9000 y 5000 Da y el correspondiente al 5.3 % de hidrólisis por péptidos de 6000 y 2000 Da. Estos autores determinan también la solubilidad y características emulsificantes de los seis hidrolizados comentados pero no estudian la cinética de la hidrólisis.

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



mecanismo que conduce a la ecuación integrada de velocidad

$$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{s_0}{s} \right) = - \frac{K_1 - K_m}{K_m (K_1 + s_0)} \cdot \frac{P}{t} + \frac{k_2 K_1 e_T}{K_m (K_1 + s_0)} \quad [2.3]$$

donde

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad y \quad K_1 = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad [2.4]$$

La ecuación [2.3] ajusta bien los resultados de cada uno de sus experimentos cinéticos considerando como P la concentración de proteína solubilizada:

$$\frac{1}{t} \ln \left(\frac{s_0}{s} \right) = K \frac{P}{t} + h \quad [2.5]$$

Sin embargo, los valores de los parámetros obtenidos que de acuerdo con la comparación de las ecuaciones [2.3] y [2.5] deberían ser

$$K = - \frac{K_1 - K_m}{K_m (K_1 + s_0)} \quad [2.6]$$

$$h = \frac{k_2 K_1 e_T}{K_m (K_1 + s_0)} \quad [2.7]$$

no varían de acuerdo con estas ecuaciones con las concentraciones iniciales de sustrato y de enzima. Estos autores detectan también una influencia apreciable sobre la cinética de la desnaturalización de la enzima y ajustan sus resultados de esta desnaturalización a una cinética de primer orden.

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

Mietsch *et al.* (1989) realizan la hidrólisis parcial de proteína de soja y caseína con Alcalasa 0.6 L y Neutrasa 0.5 L de Novo. Su interés reside principalmente en las propiedades funcionales de los hidrolizados obtenidos, siempre para grados de hidrólisis inferiores al 10 %. No obstante, determinan curvas cinéticas: grado de hidrólisis - tiempo, siguiendo la hidrólisis simultáneamente por el consumo de base y por el método del TNBS. La comparación de ambos métodos es consistente si se tiene en cuenta que el método del TNBS valora los grupos amino libres totales y no solamente los α -amino liberados en la hidrólisis.

Sanogo *et al.* (1989) estudian la proteólisis de caseína con papaína, pero analizando fundamentalmente la influencia de la composición del medio: concentraciones de cloruro sódico y de urea. Interpretan sus resultados de velocidades iniciales de reacción mediante un modelo cinético que incluye dos complejos binarios enzima-sustrato: ES, activo y SE, inactivo, y un complejo ternario SES, también inactivo. En un trabajo posterior (1990) analizan la influencia de las mismas variables sobre la distribución de péptidos obtenida en la hidrólisis.

Chobert *et al.* (1991) realizan un minucioso estudio de la acción de la tripsina sobre la β -lactoglobulina analizando los cambios de conformación que experimenta la proteína y los enlaces peptídicos específicos por los que se produce preferentemente la ruptura.

Guillon *et al.* (1991) comparan la acción de quimosina y pepsina sobre caseína analizando los péptidos formados en la hidrólisis por la acción de ambas enzimas.

Schmidt y Poll (1991) estudian la hidrólisis enzimática de las principales proteínas del suero aisladas: α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, con diferentes enzimas proteolíticas. Los dos componentes son rápidamente hidrolizados por subtilisina a pH = 8.0, 30°C y con una relación enzima/sustrato de 0.01

en peso, de manera que a los 30 minutos no queda proteína intacta visible en gel de electroforesis. Inicialmente se forman grandes péptidos, que desaparecen rápidamente y después de 4 horas sólo existen pequeños péptidos que no pueden ser detectados por el gel de electroforesis. La tripsina resulta prácticamente inactiva frente a la α -lactoalbúmina e hidroliza lentamente a la β -lactoglobulina, mientras que la quimiotripsina hidroliza rápidamente a la α -lactoalbúmina y más lentamente a la β -lactoglobulina.

2.4 PROCESOS PATENTADOS

Aunque como se indicó en el apartado anterior los procesos patentados de preparación de hidrolizados de proteínas para alimentación son frecuentes, generalmente no abordan la cinética de la hidrólisis y ponen mayor énfasis en las características utilitarias de los hidrolizados obtenidos. Por otra parte, suelen establecer límites muy amplios para las condiciones de operación utilizadas y frecuentemente no establecen claramente el grado de hidrólisis alcanzado.

Maubcis *et al.* (1981), patentan un procedimiento de hidrólisis de las proteínas del lactosuero utilizando un reactor continuo de ultrafiltración. Los intervalos de las condiciones de operación propuestos son: pH=7-9; T=40-45°C; concentración de sustrato, la existente en el lactosuero y altas relaciones enzima/sustrato, del 8-12 % en peso. La enzima utilizada es pancreatina, constituida fundamentalmente por tripsina y quimiotripsina. El pH se mantiene constante mediante adición de la base más conveniente para el producto final: KOH, Ca(OH)₂, NaOH, etc. Para la ultrafiltración propone utilizar módulos de fibra hueca de peso molecular de corte de 2000 a 10000 Da.

Chiang *et al.* (1982), describen un proceso para obtener un hidrolizado de proteínas que contiene más de 50 % en aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos y menos del 25 % en péptidos de más de 10 aminoácidos. El sustrato recomendado es lactoalbúmina libre de lactosa y se utilizan proteasas de diversos orígenes: fúngico (Takamine Brand Fungal Protease), bacteriano (Alcalasa 0.6 L), animal (Pancreatin 4Ne) y vegetal (Papain 3000). Las proteínas fúngicas dan un hidrolizado mejor tanto en sabor como en distribución de péptidos, sin embargo no se llega al 50 % deseado, por lo que para incrementar la accesibilidad del sustrato a la enzima se sugiere hervir la disolución durante 30 min en H₂SO₄ 2 % ó 10 min a pH=8 antes de la hidrólisis. Las condiciones de operación dependen del intervalo óptimo de la enzima utilizada, oscilando entre pH=3-10 y T=40-70°C. El pH se mantiene constante por la adición de Ca(OH)₂. El tiempo de hidrólisis es de 2-50 h dependiendo de las condiciones de pH y temperatura empleadas.

Chang R. Lee (1984) presenta un proceso para obtener hidrolizados de proteínas para dietas enterales, con un 95 % en péptidos de p.m. \leq 2000, un 80 % de p.m. \leq 500 y características organolép-

ticas deseables. Se parte de disoluciones con no más del 15 % en proteína, las cuales se someten a una etapa de pretratamiento. Este consiste en calentar la disolución entre 50-150°C en medio alcalino, seguido de un enfriamiento por debajo de 30°C. Todo ello evitando que la proteína se desnaturalice o la solución se gelifique. En la etapa de hidrólisis se trabaja a pHs comprendidos entre 6.5-7.5 y 40-55°C. Las enzimas utilizadas son fungal protease y pancreatina, bien añadidas en una etapa (con un intervalo de separación de 1 min aproximadamente) o en dos etapas (en este caso se añade primero la de origen fúngico). En ambos casos la enzima se desnaturaliza térmicamente: 5-10 min a 90°C ó 30-60 min a 75°C, a veces con cambios bruscos de pH. Se recomienda añadir carbón activo o bentonita (25-200 %) para mejorar el sabor y color del producto. Posteriormente se centrifuga o se filtra la disolución pasándose a un secado por liofilización o pulverización.

En la patente presentada por Parker y Pawlett en 1987 se recogen una serie de procesos para obtener hidrolizados con diferentes sabores (queso, carne, setas ...), dependiendo estos de la proteína de partida y del tiempo de reacción. La hidrólisis se realiza en dos etapas; la primera con proteinasas y la segunda con aminopeptidasas. Las condiciones de operación varían entre 25-45°C y pH=5-9.5 (a pH=7.5-8.5 se obtienen sabores suaves y a pH=5.3-5.8 estos son más fuertes).

Samuelson y Poulsen (1987) indican un procedimiento para obtener preparados que contienen péptidos de peso molecular comprendido entre 2000 - 6000 Da, principalmente entre 2000 - 2500 Da, que pueden utilizarse como:

- productos sustitutos de la leche materna
- productos para personas alérgicas o que presenten intolerancia a la lactosa
- productos para tratamiento de problemas intestinales
- preparados deportivos

El proceso se realiza en un reactor de ultrafiltración, bien en continuo o en discontinuo. La hidrólisis enzimática puede tener lugar en una o más etapas, cada una de las cuales va seguida por una ultrafiltración por 6000 Da. Las condiciones de operación utilizadas son pH=7.5-8 y 50°C. El sustrato es lactoalbúmina de la precipitación ácida de caseína en disolución al 5 %. Las enzimas utilizadas son: Rhozyme 41 PC de *Aspergillus oryzae*; Alcalasa 0.6 L de *Bacillus licheniformis*; Corolase PP, extracto pancreático y el preparado de exopeptidasas Rhozyme PC. Estas se emplean por separado o conjuntamente. Al hidrolizado obtenido se añaden sales, vitaminas, almidón, sacáridos y se concentra constituyendo el preparado dietético.

Chataud *et al.* (1988) describen un proceso para obtener una fracción rica en di-tripéptidos a partir de un hidrolizado enzimático de proteínas que contenga entre un 10-50 % de dicha fracción. Este proceso comprende:

- separación cromatográfica de las distintas fracciones del hidrolizado en una columna de cambio catiónico en forma ácida
- lavado de la columna con agua
- elución con alcali KOH ó NaOH 0.5 - 2 N
- recuperación de la fracción di-tripéptica (IR = 5 hasta pH=8)

Esta puede purificarse por ultrafiltración. A partir de ella puede prepararse dietas para nutrición oral, enteral y parenteral.

Chataud *et al.* (1988) nos presentan una serie de ensayos para obtener hidrolizados de proteínas ricos en di-tri-péptidos y con un nivel aceptable de aminoácidos libres, por acción conjunta o simultánea de tres enzimas:

- una proteasa bacteriana (pH = 5-8): Neutrased
- una proteasa bacteriana (pH = 7-11): Alcalasa
- una proteasa animal: P.E.M. y pepsina

Las condiciones de operación expuestas son: T=30-50°C; pH=7-10; $s_0 = 5-20$ % peso (ovoalbúmina, lactoalbúmina, caseína, hemoglobina...); $e_0/s_0 = 5-10$ % para las proteasas bacterianas y 0.5-1 % para las animales; tiempo de reacción menor a 300 min. Las enzimas se desactivan térmicamente: 95-100°C durante 15-10 min. El hidrolizado se purifica por ultrafiltración.

De todos los ensayos se deduce que:

La utilización de combinaciones de tres enzimas simultáneamente o introducidas con algunos minutos de diferencia lleva a un grado de hidrólisis superior al obtenido por una sola enzima o combinaciones de dos.

El orden de adición de las enzimas no afecta a los productos finales, no obstante es un factor importante en las condiciones de ciertos ensayos.

El empleo de una tercera enzima no lleva a un aumento de aminoácidos.

Especial interés muestran las asociaciones Alcalasa + Neutrased + P.E.M. y Tripsina + Alcalasa + Neutrased; u otras enzimas con sus mismas características pero de otras firmas.

Se obtienen resultados similares para $s_0 = 5-20$ % siempre que se mantenga la relación e_0/s_0 .

La distribución de pesos moleculares depende de la naturaleza de las enzimas.

De Rham (1989) patenta un procedimiento para obtener un hidrolizado de proteínas del lactosuero bajo en alergenicidad. El proceso se caracteriza por el hecho de que a una disolución de componentes del lactosuero del 0.5-5 % en peso de proteína, se le ajusta el pH entre 5.5-8.5 y se le añade Ca^{2+} hasta una concentración de 6-15 mmol/L dependiendo del producto final. En estas condiciones se calienta entre 90-140°C durante 2-10 min. Se comprueba que la alergenicidad de la β -lactoglobulina se reduce a un 0.1 % de la inicial; (test ELISA en cobayas). Este proceso es un paso intermedio en la preparación de leches para nutrición.

Jost *et al.* (1989) describen un proceso para obtener un hidrolizado de proteínas del lactosuero de alergenicidad reducida. Las enzimas utilizadas son extractos purificados o preparados comerciales de mezclas de tripsina, quimiotripsina y pancreatina. Tras una primera hidrólisis a 40-60°C y pH=7.5, el hidrolizado se trata térmicamente a 80-100°C durante 3-10 min y a un pH=6-8. Luego se somete a una segunda hidrólisis (en continuo: reactor flujo pistón, o en discontinuo: reactor mezcla perfecta) con una enzima proteolítica adecuada que hidroliza los restos intactos de la primera hidrólisis. Las enzimas se desactivan térmicamente: 75-85°C durante 5 min ó 125-135°C de 2-3 min. La alergenicidad se analiza por electroforesis y HPLC. Este hidrolizado se incorpora a preparaciones alimentarias de uso dietético, en particular a fórmulas infantiles.

Faigh *et al.* (1989) desarrollan un nuevo método de hidrólisis de proteínas alimentarias (caseína, lactoalbúmina, proteínas animales y vegetales...). Las enzimas utilizadas son de origen fúngico, *Aspergillus oryzae*, y animal, extracto de páncreas porcino, mezcladas en proporciones 0.9:1 a 1.1:1. Las disoluciones de sustrato son al 10 % w/v. Se trabaja a pHs comprendidos entre 7-7.5 y a 50°C. El tiempo de reacción es el necesario para alcanzar el grado de hidrólisis deseado: 8-24 h. Las enzimas se desactivan por tratamiento con calor 90°C durante 10 min. Es un proceso especialmente útil para hidrolizar proteínas de soja, ya que no produce productos amargos en el transcurso del mismo.

2.5 OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION

El trabajo que se describe en la presente Memoria forma parte de una línea de investigación del Grupo de Biorreactores del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada en colaboración con el Departamento de Investigación y Desarrollo de Unión Industrial y Agroganadera S.A. (U.N.I.A.S.A.) encaminada a desarrollar la tecnología adecuada para la fabricación de hidrolizados enzimáticos de proteínas, concretamente de proteínas del suero láctico y de caseína, con vistas a la preparación de dietas especiales para lactantes y adultos enfermos.

En una primera etapa se pretende obtener a partir de proteínas lácteas hidrolizados enzimáticos de peso molecular inferior a 1000 Da y un alto contenido en di y tripéptidos, de manera que sean osmóticamente equilibrados, hipoadérgicos y de escaso sabor amargo. Estos hidrolizados deben tener el mínimo contenido posible en sales minerales y un valor biológico superior al 95 % con respecto de la proteína de partida.

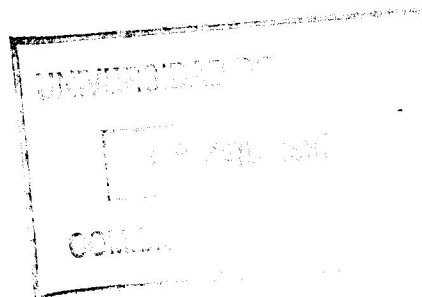
En una segunda etapa se pretende separar de los hidrolizados anteriores aminoácidos específicos, tales como: fenilalanina, tirosina y metionina, con vistas a la preparación de dietas especiales para el tratamiento de enfermedades congénitas del metabolismo.

Correspondiente a la primera etapa el objetivo planificado para el desarrollo de esta Tesis Doctoral consistió en el estudio cinético y de distribución de tamaños moleculares de la hidrólisis de las proteínas del suero láctico, Lactoalbúmina comercial, con diferentes proteasas comerciales de grado alimentario, tanto de origen animal como de origen microbiano.

La necesidad de separar enzimas de los hidrolizados obtenidos, así como los péptidos resistentes a la hidrólisis de peso molecular superior a 1000 Da, hizo incluir entre los objetivos propuestos el estudio de esta separación por ultrafiltración utilizando membranas de peso molecular de corte adecuado.

El estudio de ambos procesos: hidrólisis enzimática y separación posterior tiene como misión determinar la configuración del equipo y modo de operación más idóneos para llevarlos a cabo a escala industrial, así como los valores óptimos de las variables de operación.

3. MATERIALES Y METODOS



3.1 MATERIALES

3.1.1 Sustratos

El sustrato utilizado en esta investigación es:

Lactoalbúmina 75 L: suministrada por MILEI (Alemania). Se ha determinado su contenido en nitrógeno total por el método Kjeldahl (Norma UNE 64011) y su humedad, por deshidratación en estufa de vacío a 60°C durante 24 h, resultando un 73 % en proteína y un 6 % en humedad. Su composición en materia grasa y sales minerales nos ha sido suministrada por el Departamento I+D de U.N.I.A.S.A.: grasa: 3.35 %; cenizas: 3.20 %; lactosa (monohidratada): 4.30 %; sales (mg/100 g): Na⁺:163.1; K⁺:445.3; Ca²⁺:670.4; Mg²⁺:66.0; Fe²⁺:1.3; Zn²⁺:0.78; Cl:31.3; PO₄³⁻:1296.6; NO₂:2.2 ppm; NO₃:18.6 ppm.

3.1.2 Proteasas

De las enzimas comerciales tabuladas en 2.8, se han elegido los siguientes preparados:

MKC Protease 660 L: es un preparado suministrado por los laboratorios Miles (Madrid). Es una mezcla de proteasas neutras, ácidas y alcalinas, obtenidas por fermentación controlada de *Bacillus subtilis*. Según el fabricante, actúa en un rango de pH comprendido entre 7 y 10, pero incluso a valores de pH < 6 y pH > 11, la enzima puede mostrar una actividad considerable. El rango óptimo de temperatura es 50-70°C y no necesita ningún tipo de activadores.

La actividad de esta proteasa ha sido medida experimentalmente en nuestro laboratorio mediante el método modificado de Anson (1978), que se describe en el apartado 3.2.2, y ha resultado ser de 6.6 UA/mL.

Para comprobar si la enzima es estable en nuestras condiciones de operación, pH = 8.0 y 50°C, se toman 100 µL de enzima y se añaden a 200 mL de disolución al 10% de tampón fosfato y se mantienen a 50°C. A intervalos regulares de tiempo se toman muestras y se realiza el ensayo de actividad Anson. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.1. De estos valores parece deducirse que no existe una desactivación apreciable de la enzima en el intervalo de tiempos ensayado.

Tabla 3.1
Medida de la estabilidad térmica de la enzima Protease 660 L a 50°C

muestra	t, h	pH	Abs, 750 nm	UA/mL enzima
1	0.0	8.08	0.380	6.60
2	0.0	8.08	0.378	6.60
3	0.5	8.07	0.380	6.60
4	0.5	8.07	0.384	6.68
5	1.0	8.06	0.387	6.75
6	1.0	8.06	0.395	6.90
7	2.0	8.04	0.378	6.60
8	2.0	8.04	0.374	6.52
9	3.0	8.02	0.376	6.52
10	3.0	8.02	0.340	5.90

Los datos de la bibliografía, Roger *et al.* (1981), Olofsson (1980) y Jost *et al.* (1989), parecen indicar que la Protease 660 L se desactiva a 100°C durante 2 min. Para comprobar este hecho se han realizado experimentos en los que se ha estudiado la influencia del pH, de la temperatura, y de ambas variables simultáneamente. Para realizar estos ensayos se fijan unas condiciones de hidrólisis (pH=8.0, T=50°C, $s_0 = 38.45$ g/L y $e_0 = 3.3$ UA/L) y transcurrida media hora, se toma una muestra de 5 mL y se le añade 0.5 mL de ClH 1.0 N y se analiza mediante el método del TNBS, que se describe en el apartado 3.2.3.1.

La suspensión restante se divide en dos partes (de unos 45 mL) y a una de ellas se le añaden 5 mL de ClH 0.1 N y ambas alícuotas se introducen en agua hirviendo. Periódicamente se toman muestras, en las que se determina el DH por el método del TNBS. Los resultados obtenidos se indican en la tabla 3.2.

Es de destacar que la adición de pequeñas cantidades de ácido, no parece influir apreciablemente en la velocidad de desactivación y que por tanto es suficiente calentar la enzima durante 5 min a 100°C para que esta se desnaturalice.

Tabla 3.2
Ensayos de desnaturalización de la enzima Protease 660 L a 100°C

t, min	Abs, 420 nm	
	Medio CIH 0.1 N	sin ácido
0	0.359	-----
2	0.382	0.379
5	0.352	0.361
20	0.348	0.393
30	-----	0.350

Ensayo a t = 0 con CIH 1.0 N

Alcalasa 0.6 L: es una mezcla comercial de Novo Industrias (Madrid). Esta enzima proteolítica se prepara por fermentación sumergida de una cepa seleccionada del *Bacillus licheniformis*. Su principal componente enzimático es Subtilisin A (Subtilisin Carlsberg), que es una endoproteinasa de tipo serínico. El rango óptimo de temperaturas es 50-70°C y actúa a pH comprendidos entre 6 y 10.

Su actividad determinada por el método modificado de Anson (1978) ha sido 1.01 UA/g. La enzima es estable a 50°C y se desactiva por calentamiento a 85°C durante 2 min, información técnica de NOVO Industrias (1989).

P.E.M. 2500 S: es un complejo proteolítico formado por enzimas pancreáticas purificadas. Consiste en una mezcla, libre de sales, de tripsina bovina, tripsina porcina y quimiotripsina bovina. Este preparado presenta su máxima actividad a pH=8.0. El rango óptimo de temperaturas depende de la proporción en el producto entre tripsina bovina y porcina, oscilando entre 38°C y 50°C que son las temperaturas óptimas de cada una de ellas.

Su actividad se ha determinado experimentalmente según el método modificado de Anson y presenta un valor global de 20.84 UA/g. La enzima se desactiva calentando a 100°C durante 5 min, Jost *et al.* (1989).

3.2 METODOS

3.2.1 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.

Se pesan de 0.15 a 0.30 g, se introduce la muestra en un matraz Kjeldahl; se añaden 2 g de catalizador (2 g 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 20 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. Este se acopla en el aparato de destilación, se añaden 25 mL de la disolución alcalina y, se procede a la destilación del amoníaco que se recoge sobre un matraz erlenmeyer, que contiene 10 mL de la disolución de ácido bórico 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 40 a 50 mL. Terminada la destilación (4 min), se añaden unas gotas del indicador y se valora con disolución de ácido clorhídrico hasta viraje del indicador a color violeta. El factor Kjeldahl para la conversión del nitrógeno amoniacal en proteína bruta es 6.38, tabla 3.4.

3.2.2 Determinación de la actividad enzimática. Método modificado de Anson

Este procedimiento es un ensayo normalizado para determinar la actividad de las proteasas. El método utilizado en este trabajo está recogido en la información técnica suministrada por NOVO Industrias (1978).

En este ensayo se hidroliza hemoglobina desnaturalizada con una cierta cantidad de la proteasa problema a $\text{pH}=7.5$, 25°C y 10 min. Transcurrido este tiempo, la hemoglobina no hidrolizada se precipita con ácido tricloroacético, TCA, y al sobrenadante, después de filtrar, se le añade reactivo fenólico que produce un 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, en este caso tripsina pancreática, que se somete a los mismos ensayos que la proteasa problema.

Una unidad anson, UA, es la cantidad de enzima que en las condiciones de reacción normalizadas, $\text{pH}=7.5$, 25°C y 10 min, hidroliza a la hemoglobina con una velocidad inicial tal que se liberan por minuto una cantidad de productos solubles en TCA, que dan el mismo color con reactivo fenólico que un miliequivalente de tirosina.

Reactivos

- Sustrato de hemoglobina
- Hidróxido sódico 0.5 N
- Tampón fosfato 1/15 M, $\text{pH}=7.5$
- KH_2PO_4 1 M
- Acido tricloroacético 0.3 N, TCA
- Reactivo fenólico, Folin-Ciocalten Phenol Reagent, Merck (9001)

Preparación del sustrato de hemoglobina

Se pesan 28.85 g de urea, R.A. y se disuelven en agua desionizada a 25°C con una agitación suave para evitar la formación de espumas. A continuación se añaden 6 g de NaOH 1 N agitando continuamente.

Se pesan 1.5863 g de hemoglobina liofilizada, Merck (4300) que se añaden lentamente a la solución anterior y se agita la solución durante 45 min a 25°C . A continuación se añaden 7.89 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 1 M y se continúa agitando hasta homogeneización. Se enrasa a 100 mL con agua destilada y se ajusta el pH a 7.5

El tiempo máximo de almacenamiento de este sustrato es 14 días a 5°C .

Procedimiento

Las enzimas a analizar se disuelven en una disolución de tampón fosfato al 10 % (1 mL de tampón fosfato 1/15 M en 10 mL de disolución). Se pipetea 1 mL de esta disolución de enzima en 4 tubos de ensayo: 2 como muestra (S) y 2 como blanco (B). A tiempo cero, se añaden 2 mL de sustrato de hemoglobina a 25°C a las muestras (S), y se agita. Se llevan a un baño a 25°C.

A los blancos (B) se añaden 5 mL de TCA, se agitan vigorosamente, y a continuación se le agregan 2 mL de sustrato de hemoglobina; se agitan y se llevan también al baño de 25°C.

Transcurridos 10 min a 25°C, se añaden 5 mL de TCA a las muestras (S) con objeto de parar la reacción. Se esperan 20 - 30 min, se agita tanto las muestras como el blanco y se filtra a través de un filtro Berzelius No. 0. A continuación se toman 2 mL de cada uno de los filtrado y se llevan a sendos erlenmeyers de 25 mL, en los que previamente se pusieron 4 mL de NaOH 0.5 N. A estos se añaden 1.20 mL del reactivo fenólico (diluido con dos partes de agua) y se agita magnéticamente. A los 8 min de añadir el reactivo fenólico se mide la absorbancia a 750 nm entre las muestras y los blancos. Previamente se debe medir la absorbancia de los blancos frente a agua destilada. Si ésta es mayor de 0.16, el sustrato de hemoglobina se desecha, y se prepara de nuevo.

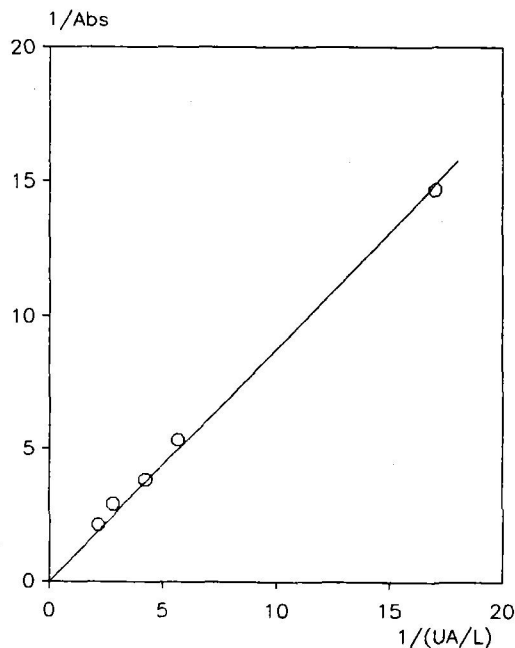


Figura 3.1 Línea patrón. Método modificado de Anson

Para obtener la línea de calibrado, se utiliza como referencia una enzima de actividad conocida, tripsina pancreática (Tripsin Pankreasprotease Merck), de 2.47 UA/g. Tras las oportunas diluciones, se toman 5 valores de UA/L y una vez sometidas al procedimiento antes descrito, se mide su absorbancia, Abs, a 750 nm frente a los blancos, procurando que ésta esté comprendida en el intervalo de $Abs \geq 0.100$ a $Abs \leq 0.650$. Cada vez que se prepare un nuevo sustrato de hemoglobina o un nuevo reactivo fenólico es necesario realizar una línea de calibrado.

En la tabla 3.3 se indican a título de ejemplo, los datos obtenidos en la preparación de una línea patrón, figura 3.1.

Tabla 3.3
Recta patrón del método modificado de Anson

muestras	c, g/L	1/c	UA/L	1/(UA/L)	Abs	1/Abs
1	0.0238	42.02	0.0588	17.01	0.068	14.71
2	0.0714	14.01	0.1764	5.67	0.187	5.35
3	0.0952	10.50	0.2351	4.25	0.263	3.82
4	0.1428	7.00	0.3527	2.84	0.344	2.91
5	0.1904	5.25	0.4703	2.13	0.469	2.13

3.2.3 Medida del grado de hidrólisis

Para el seguimiento de la cinética de la hidrólisis de una proteína es necesario determinar el grado de hidrólisis, DH, alcanzado, definido según Adler-Nissen (1982) por:

$$DH = \frac{\text{n}^\circ \text{ de enlaces peptídicos hidrolizados}}{\text{n}^\circ \text{ total de enlaces peptídicos susceptibles de hidrólisis}} \times 100 \quad [3.1]$$

o bien expresado como conversiones, $x = DH/100$.

La determinación del grado de hidrólisis se puede realizar por dos procedimientos: método del TNBS y del pH-estato.

3.2.3.1 Método del TNBS

La medida del DH mediante el TNBS, se basa en que la reacción de trinitrofenilación entre aminas, y grupos amino libres de aminoácidos y proteínas, con el 2,4,6 trinitrobencenosulfónico conduce a la formación de productos coloreados, cuya absorbancia se mide a 420 nm. Como referencia se utilizan componentes aminos, glicina, alanina, alanil-alanina, etc que se someten al mismo ensayo que la muestra problema. El método es sensible hasta 10^{-5} M y está indicado para medir el grado de hidrólisis de productos proteínicos en polvo o en disolución, Snyder y Sobocinsky (1975).

Reactivos

- 2,4,6 trinitrobenzenosulfónico, TNBS (Aldrich Chemie 17299.5)
- Glicina, alanina, alanil-alanina y alanil-alanil-alanina de Sigma
- Tetraborato sódico, reactivo para análisis

Procedimiento

Se toman alícuotas de 1 mL del hidrolizado de proteínas, y tras desnaturalizar la enzima, se disuelven en tetraborato sódico 0.10 M. En nuestros experimentos estas diluciones eran del orden de 1:1000. Se toman 2 mL de estas diluciones y se le añaden 50 μ L de TNBS 0.03 M. Se agita hasta conseguir una mezcla completa, y durante 30 min se deja reaccionar a 25°C y en frascos topacio. El blanco consiste en 50 μ L de TNBS 0.03 M y 2 mL de tetraborato 0.10 M. A los 30 min justos se mide la absorbancia a 420 nm.

Para preparar la recta de calibrado se utilizan componentes aminos, glicina, alanina, alanil-alanina y alanil-alanil-alanina, que se someten a los mismos ensayos que la muestra problema.

El grado de hidrólisis se calcula como el cociente entre el número de enlaces peptídicos rotos evaluados a partir de la recta de calibrado, y el número de enlaces peptídicos totales, tabulados en bibliografía para cada proteína, tabla 3.4.

Tabla 3.4
Factores Kjeldahl, f, y valores de h_{tot} para diversas proteínas

Proteína	Factor f	h_{tot} , eq-g/kg
Caseína	6.38	8.2
Proteínas del lactosuero	6.38	8.8
Carne	6.25	7.6
Pescado	6.25	7.3
Soja	6.25	7.8
Trigo	5.70	8.3

En las tablas 3.5 a 3.8 se recogen los resultados experimentales obtenidos en la preparación de las líneas patrón para cada uno de los componentes aminos utilizados, que se representan en las figuras 3.2 a 3.5

Tabla 3.5
Método del TNBS. Recta de calibrado. Componente amino: Glicina

muestra	$c \cdot 10^3$, g/L	$c \cdot 10^5$, M	Abs, 420 nm
1	0.8464	1.1278	0.132
2	0.8464	1.1278	0.122
3	1.2696	1.6917	0.248
4	1.2696	1.6917	0.258
5	1.6928	2.2555	0.344
6	1.6928	2.2555	0.327
7	2.1160	2.8194	0.422
8	2.1160	2.8194	0.404
9	2.5392	3.3833	0.497
10	2.5392	3.3833	0.504
11	2.9624	3.9472	0.575
12	2.9624	3.9472	0.614
13	3.3856	4.5110	0.696
14	3.3856	4.5110	0.686

Tabla 3.6

Método del TNBS. Recta de calibrado. Componente amino: Alanina

muestra	$c \cdot 10^3$, g/L	$c \cdot 10^5$, M	Abs, 420 nm
1	1.0330	1.1595	0.165
2	1.4462	1.6233	0.197
3	1.6528	1.8552	0.212
4	1.8594	2.0871	0.242
5	2.2726	2.5509	0.327
6	2.6858	3.0147	0.366
7	2.8924	3.2466	0.380
8	3.0990	3.4785	0.414
9	3.3056	3.7104	0.420
10	3.3056	3.7104	0.418
11	3.7188	4.1742	0.460
12	3.7188	4.1742	0.477
13	4.1320	4.6380	0.521
14	4.1320	4.6380	0.529

Tabla 3.7
Método del TNBS. Recta de calibrado. Componente amino: Alanil-Alanina

muestra	$c \cdot 10^3$, g/L	$c \cdot 10^5$, M	Abs, 420 nm
1	0.8288	0.5273	0.060
2	1.2432	0.7760	0.092
3	1.6576	1.0347	0.117
4	2.0720	1.2934	0.141
5	2.4864	1.5520	0.168
6	3.1080	1.9400	0.216
7	4.1441	2.5868	0.280
8	5.1800	3.2334	0.392
9	6.2160	3.8804	0.452
10	7.2520	4.5268	0.554
11	8.2880	5.1735	0.629

Tabla 3.8

Método del TNBS. Recta de calibrado. Componente amino: Alanil-Alanil-Alanina

muestra	$c \cdot 10^3$, g/L	$c \cdot 10^5$, M	Abs, 420 nm
1	2.0440	0.8841	0.085
2	4.0880	1.7682	0.230
3	6.1320	2.6522	0.297
4	8.1760	3.5363	0.421
5	10.2200	4.4204	0.548
6	11.2640	5.3045	0.665

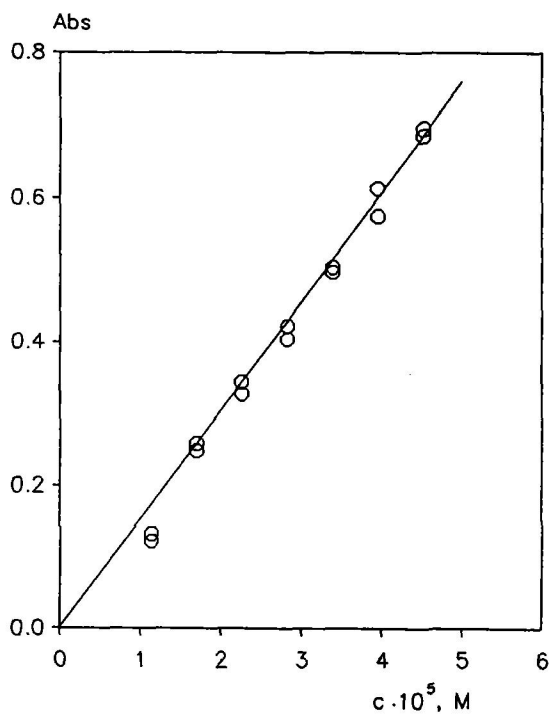


Figura 3.2 Glicina

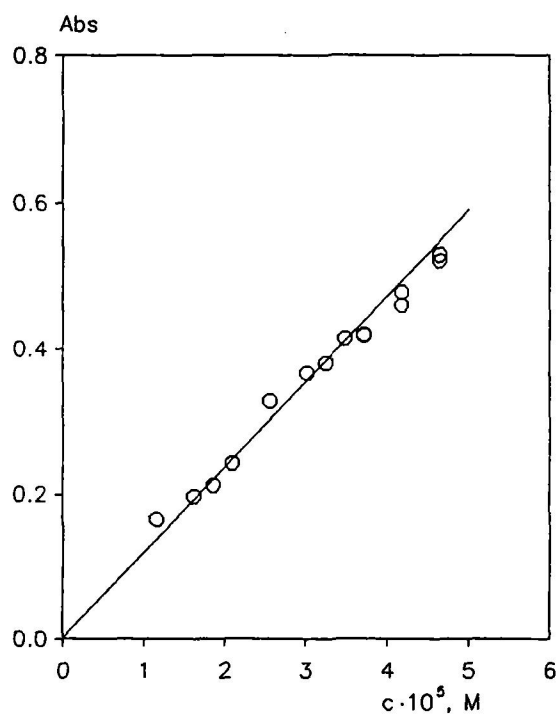


Figura 3.3 Alanina

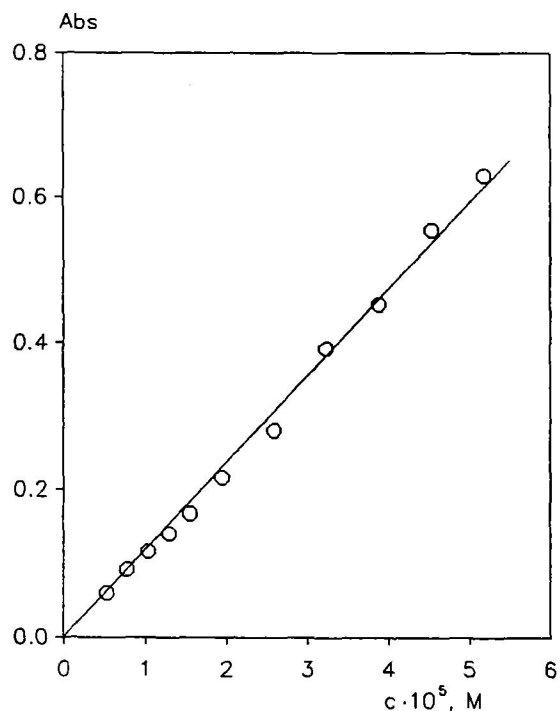


Figura 3.4 Alanil-alanina

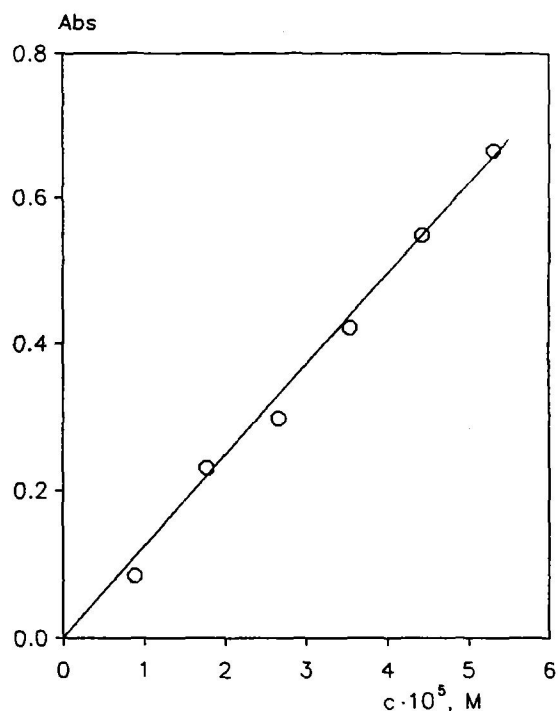


Figura 3.5 Al-Al-alanina

Rectas de calibrado. Método del TNBS

3.2.3.2 Método del pH-estado

Para seguir la cinética del proceso, se ha medido el consumo de base en función del tiempo, ya que la cantidad de base necesaria para mantener constante el pH es proporcional al grado de hidrólisis, DH. La relación entre ambos viene dada por la siguiente ecuación

$$DH = \frac{B \cdot N_B}{M_p} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_{tot}} 100 \quad [3.2]$$

donde

B = consumo de base, L

N_B = normalidad de la base

M_p = masa de proteína (N Kjeldahl), kg

α = grado de disociación

h_{tot} = número de enlaces peptídicos en la proteína, eq-g/kg (tabla 3.4)

El grado de disociación, α, viene dado por

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH} - \text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}}} \quad [3.3]$$

En la tabla 3.9 se recogen los valores de $1/\alpha$ para varios pH y temperaturas, Novo Industrias (1989). Estos valores se han obtenido a partir de la hidrólisis de proteína de soja con Alcalasa y se pueden aplicar con carácter general siempre que $\text{DH} \leq 20\%$. La extrapolación a $\text{DH} > 20\%$ no es recomendable puesto que el pK global se incrementa conforme decrece la longitud de los péptidos. En estos casos se debe aplicar la expresión [3.3].

Tabla 3.9
Valores de $1/\alpha$ para distintos pH y temperaturas

T °C	25°	30°	40°	50°	60°
pK	7.7	7.6	7.3	7.1	6.9
pH					
6.5				5.00	3.50
7.0		5.00	3.00	2.27	1.79
7.5	2.59	2.27	1.63	1.40	1.25
8.0	1.50	1.40	1.20	1.13	1.08
8.5	1.16	1.13	1.06	1.04	1.03
9.0	1.05	1.04	1.02	1.01	1.01
9.5	1.02	1.01	1.01	1.00	1.00
10.0	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00
10.5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
11.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Los grados de hidrólisis, DH, obtenidos mediante el consumo de base, ecuación [3.2], se han comparado con los calculados por el método del TNBS. En la tabla 3.10, se recogen algunos de los resultados obtenidos con uno y otro procedimiento.

Tabla 3.10

Comparación entre DH evaluados por los métodos del pH-estado y TNBS, T = 50°C

SUSTRATO	pH	DH, %	
		pH-ESTATO	TNBS
Lactoalbúmina	8.5	20.6	13.2 (1)
			20.2 (2)
			16.7 (3)
			16.2 (4)
Lactoalbúmina	9.0	18.5	15.6 (1)
			23.6 (2)
			19.8 (3)
			19.1 (4)
Caseína	8.0	20.6	17.2 (1)
			22.3 (2)
			21.4 (3)
			20.8 (4)
Caseína	8.0	22.3	25.2 (1)
			30.3 (2)
			30.7 (3)
			30.0 (4)

(1), (2), (3) y (4). Grados de hidrólisis medidos frente a Glicina, Alanina, Alanil-alanina y Al-Al-alanina respectivamente

En ella se observa una coincidencia apreciable entre unos y otros datos para $DH \leq 20\%$ y distintos sustratos y valores del pH. En general el valor del grado de hidrólisis evaluado por el método

del TNBS es mayor al evaluado por el método del pH-estado, pues en el primer caso se miden todos los grupos amino libres, tanto los provenientes de la hidrólisis como los propios de la proteína. Si $DH > 20\%$ se observa una diferencia apreciable entre los resultados obtenidos por uno y otro método debido a que los valores de α a utilizar en estos casos serían distintos a los valores tabulados en 3.9, ya que el pK de aminoácidos y dipéptidos es mayor de 7.1, tabla 3.9. Para $DH \leq 20\%$ se observa que los valores del grado de hidrólisis evaluados por el método del pH-estado son más coincidentes con aquellos obtenidos mediante el método del TNBS utilizando como referencia un di- o tripéptido, lo cual parece poner de manifiesto que los componentes mayoritarios de estos hidrolizados están formados por sustancias de peso molecular medio 500.

De manera semejante a Mietsch *et al.* (1989) se han correlacionado los valores del grado de hidrólisis calculados mediante el método del pH-estado, DH_{pH} , y los determinados por el método del TNBS, DH_{TNBS} , para un experimento en el que se siguió por ambos métodos el desarrollo de la hidrólisis, tabla 3.11.

Tabla 3.11

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

pH=8.0 T=50°C $e_0=3.30$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

t, min	DH_{pH}	DH_{TNBS}			
		Glicina	Alanina	Al-Al	Al-Al-Al
0	0.00	2.84	4.20	3.17	3.22
15	6.50	6.97	10.52	8.59	8.42
30	8.63	7.83	11.81	9.70	9.48
60	11.17	8.79	13.26	10.94	10.67
120	13.12	9.51	14.36	11.88	11.57
180	14.96	11.35	17.16	14.29	13.88

Estos resultados se representan en la figura 3.6, a partir de la cual se obtienen las ecuaciones

$$\text{para Glicina} \quad DH_{TNBS} = 3.05 + 0.53 \cdot DH_{pH} \quad r^2 = 0.99 \quad [3.4]$$

$$\text{para Alanina} \quad \text{DH}_{\text{TNBS}} = 4.54 + 0.81 \cdot \text{DH}_{\text{pH}} \quad r^2 = 0.98 \quad [3.5]$$

$$\text{para Al-Al y Al-Al-Al} \quad \text{DH}_{\text{TNBS}} = 3.48 + 0.68 \cdot \text{DH}_{\text{pH}} \quad r^2 = 0.98 \quad [3.6]$$

con una ordenada en el origen positiva como era de esperar ya que el método del TNBS valora también los grupos amino de los restos de los aminoácidos.

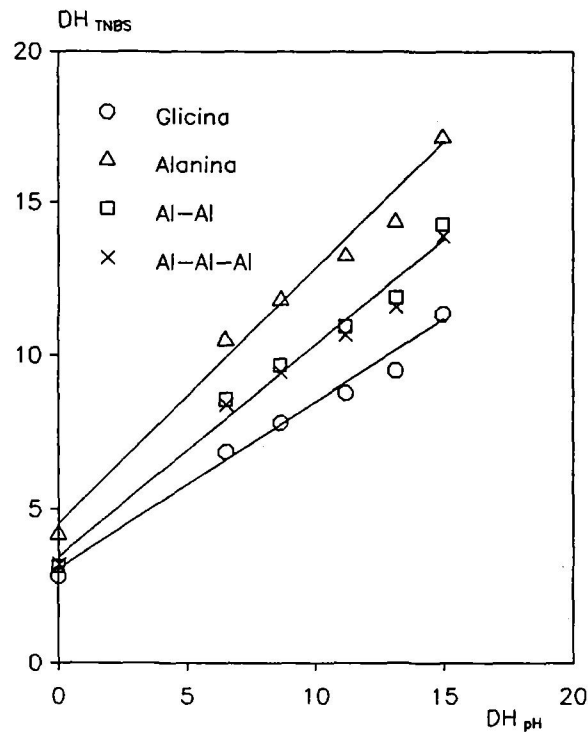


Figura 3.6

3.2.4 Distribución de tamaños 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 - 60000 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. Sin embargo cuando se trata de péptidos sintéticos aparecen reacciones alergénicas a pesos moleculares del orden de 1600 Da.

La determinación de la distribución de pesos moleculares en el hidrolizado se realiza utilizando 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 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 efluyentes de la columna se controlan mediante lecturas de absorbancia a 280 nm. Las proteínas y péptidos utilizados como referencia se recogen en la tabla 3.12

Tabla 3.12

	c, mg/mL	P.M.	t _R , min	
			Individual	Mezcla
Ovoalbúmina	6.8	44000	10.49	10.45
Quimitripsinógeno	8.8	25000	12.49	12.49
Ribonuclease A	6.0	13700	14.29	14.26
Insulina	10.0	6000	16.89	16.87
Insulina A	4.8	2531	17.81	17.80
Sleep peptide	1.2	849	19.66	19.67
Phe-Gly-Gly	11.2	279	20.71	20.61
Arginina	12.0	174	19.88	-----

En la figura 3.7 se representa el tamaño molecular en función del tiempo de retención y constituye la curva de calibrado para la estimación de la distribución de pesos moleculares en los hidrolizados.

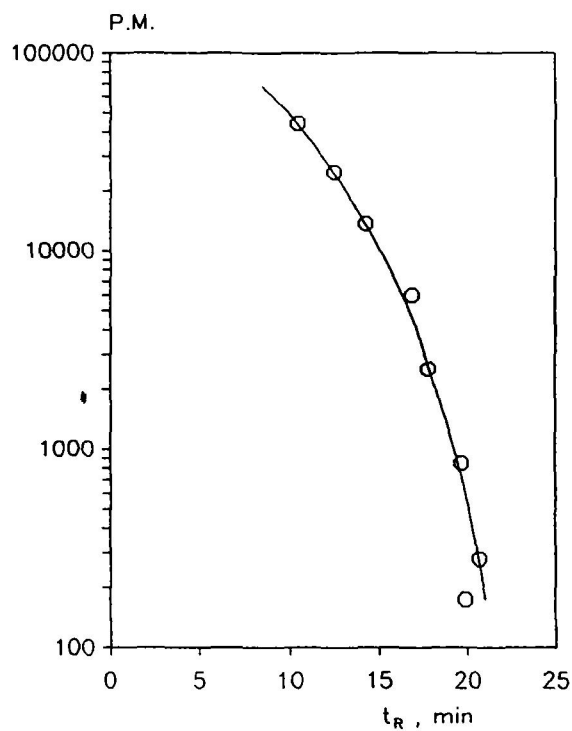


Figura 3.7 Línea patrón. HPLC

El análisis cromatográfico del sustrato original una vez alcanzadas las condiciones de operación pero previamente a la adición de enzima, figura 3.8, se indica en la tabla 3.13

Tabla 3.13

Lactoalbúmina 75 L disuelta a 50°C y pH=8.0

t_R , min	PM, kDa	Componente	% área cromatográfica
10.1	60	seroalbúmina	15.0
11.3	32		
12.7	23	β -lactoglobulina	43.9
14.5	13	α -lactoalbúmina	24.4
> 20	< 1	hidrólisis parcial	16.7

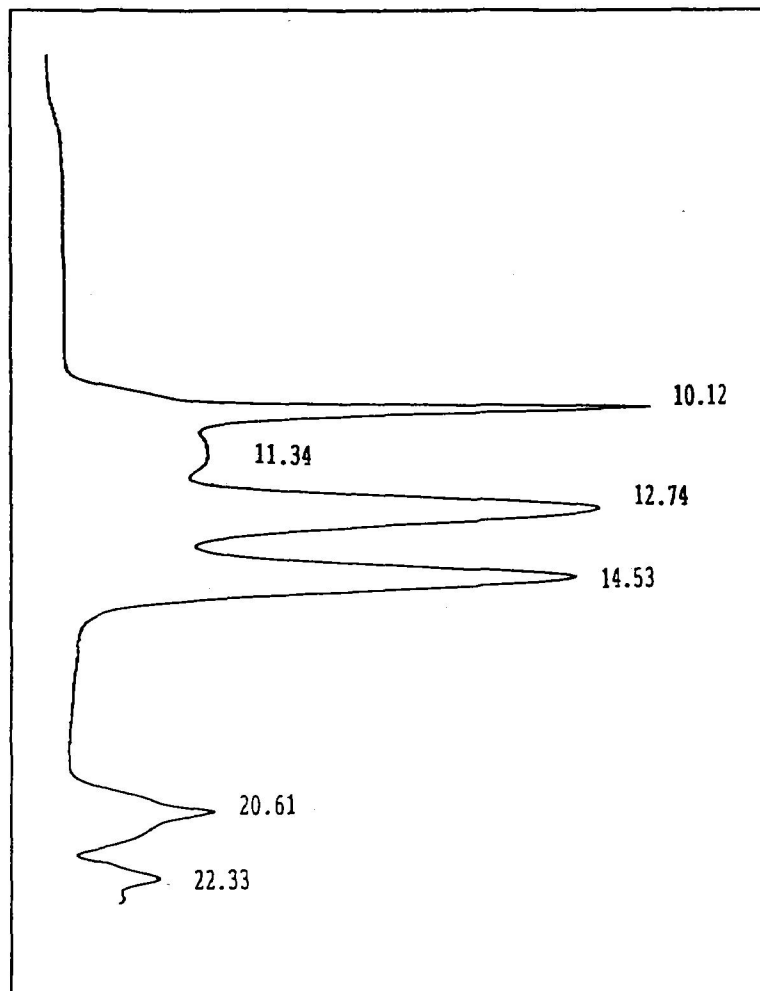


Figura 3.8 Distribución de tamaños moleculares. Lactoalbúmina

en la que se observa un porcentaje apreciable de péptidos pequeños que debe corresponder a la hidrólisis parcial producida en la preparación de la lactoalbúmina comercial y en el tiempo transcurrido hasta que se alcanzan las condiciones de operación.

A título de ejemplo se muestran también en las figuras 3.9 y 3.10 un cromatograma correspondiente a una situación intermedia, $DH = 13\%$, y otro correspondiente a la situación final, $DH > 20\%$. En la figura 3.9 se observa que la separación cromatográfica conseguida no es muy buena por lo que ha sido necesario distribuir las áreas cromatográficas en intervalos amplios de peso molecular. En la figura 3.10 se observa que para un grado de hidrólisis superior al 20% prácticamente todos los péptidos son de un tamaño molecular inferior a 1000 Da salvo una pequeña fracción de seroalbúmina resistente a la hidrólisis.

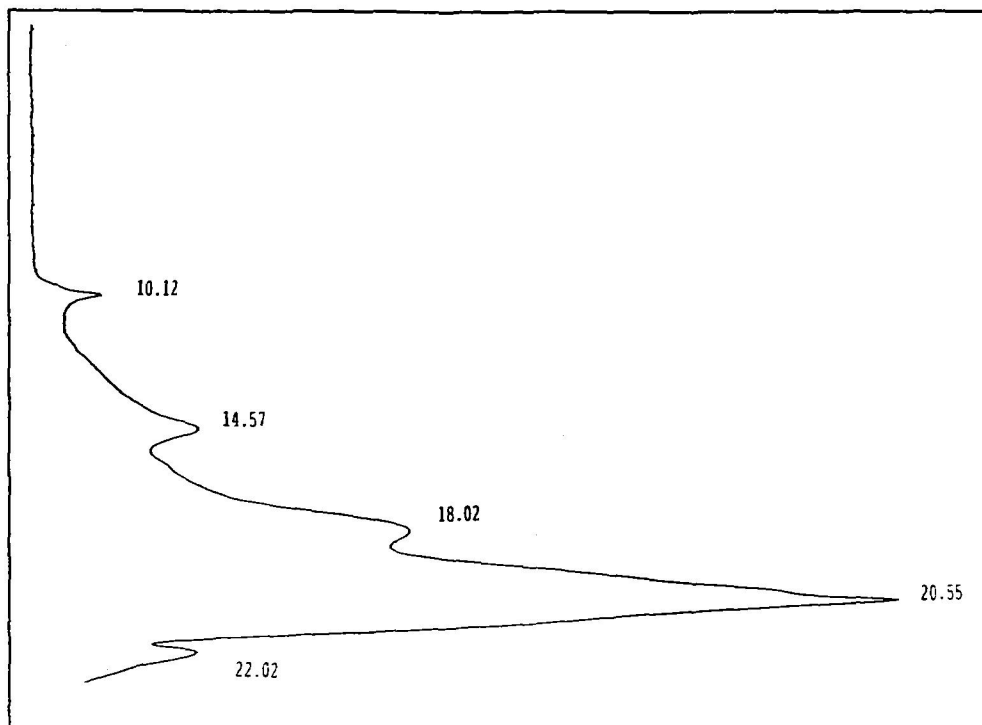


Figura 3.9 Distribución de tamaños moleculares. $DH = 13\%$

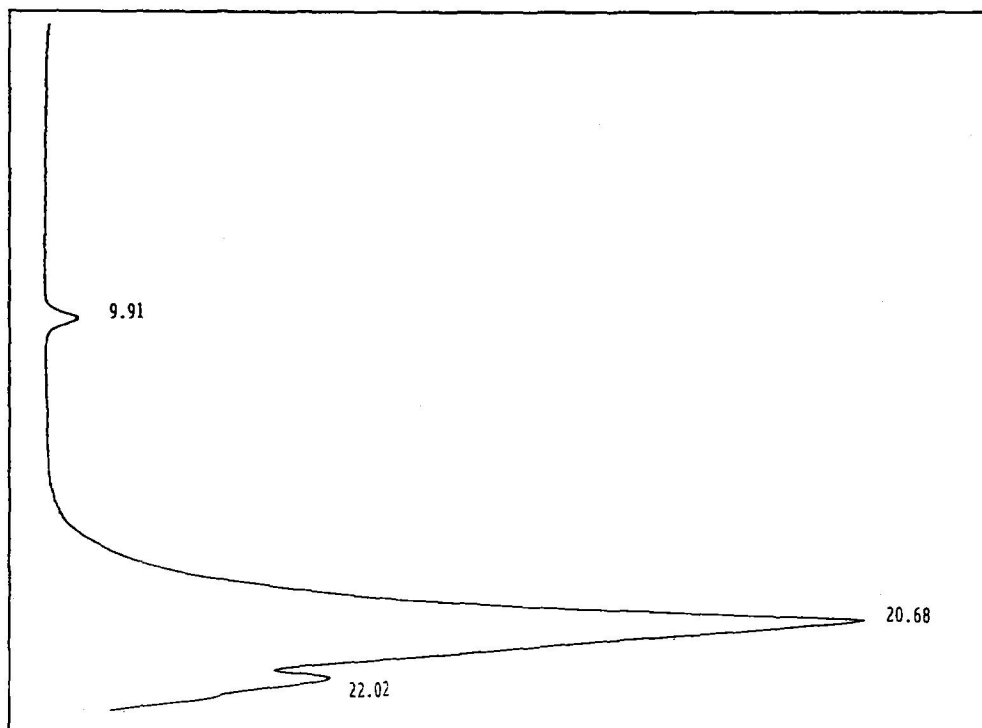


Figura 3.10 Distribución de tamaños moleculares. $DH > 20\%$

3.2.5 Medida de la alergenicidad: test-ELISA

Para la valoración de la hipoadalergenicidad de los hidrolizados se relaciona la distribución de los pesos moleculares de los mismos con el % de inhibición de respuesta de IgG anti (α -caseína o β -lactoglobulina); el método se describe a continuación.

Procedimiento

Se fijan 200 μ L de α -caseína (10 μ g/mL) ó β -lactoglobulina (50 μ L/mL) en tampón bicarbonato/-carbonato pH=9.6 en placas Microtiter y se incuba a 4°C durante toda la noche. Después se lava 3 veces con tampón fosfato salino pH=7.4 adicionado de gelatina al 1 % y Tween 20 al 0.5 % (tampón PBSGT), y los lugares libres se bloquean con 200 μ L de albúmina al 1 % en PBSGT para lo cual se incuba durante 30 minutos a 37°C. Después de esto se vuelve a lavar 3 veces con PBSGT.

A continuación se añaden 100 μ L de disoluciones de hidrolizados de proteínas o fórmulas que lo contengan en diferentes concentraciones. Asimismo, se añadirá en cada pocillo 100 μ L de un suero de conejo purificado. La obtención de sueros con alta concentración en IgG anti α -caseína o IgG anti β -lactoglobulina se llevó a cabo mediante la inmunización de conejos con α -caseína o β -lactoglobulina, por vía intramuscular en IgG anti α -caseína o IgG anti β -lactoglobulina, según el caso; de este modo, estos sueros podrán unirse al antígeno fijado en la placa o al que proceda de la disolución de hidrolizado o fórmula, dependiendo de la potencial alergenicidad de los mismos. Se incuba a 37°C durante 2 h, tras lo que se lava 3 veces con PBSGT.

Posteriormente se añade 200 μ L de suero anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano en dilución 1:5000 en PBSGT, tras lo cual se incuba la placa 2 h a 37°C y se vuelve a lavar 3 veces con PBSGT.

Se añade ahora 150 μ L de sustrato: 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina en tampón citrato. Tras la aparición de color azul, se detiene la reacción con 50 μ L de H₂SO₄ 2.5 N tornando la coloración hacia amarillo, que presenta su máximo de absorción a 450 nm.

El porcentaje de inhibición (alcanzado por los diferentes hidrolizados o fórmulas) respecto del logrado por el suero (IgG) anti α -caseína o IgG anti β -lactoglobulina) es considerado como medida de la potencial alergenicidad de los mismos.

Con estos datos se obtienen las curvas de inhibición, donde en abcisas se representa el logaritmo de la concentración de proteína y en ordenadas el porcentaje de inhibición alcanzado

3.3 DISPOSITIVO Y TECNICA EXPERIMENTAL

El dispositivo experimental utilizado se esquematiza en la figura 3.11 y consta de las siguientes partes:

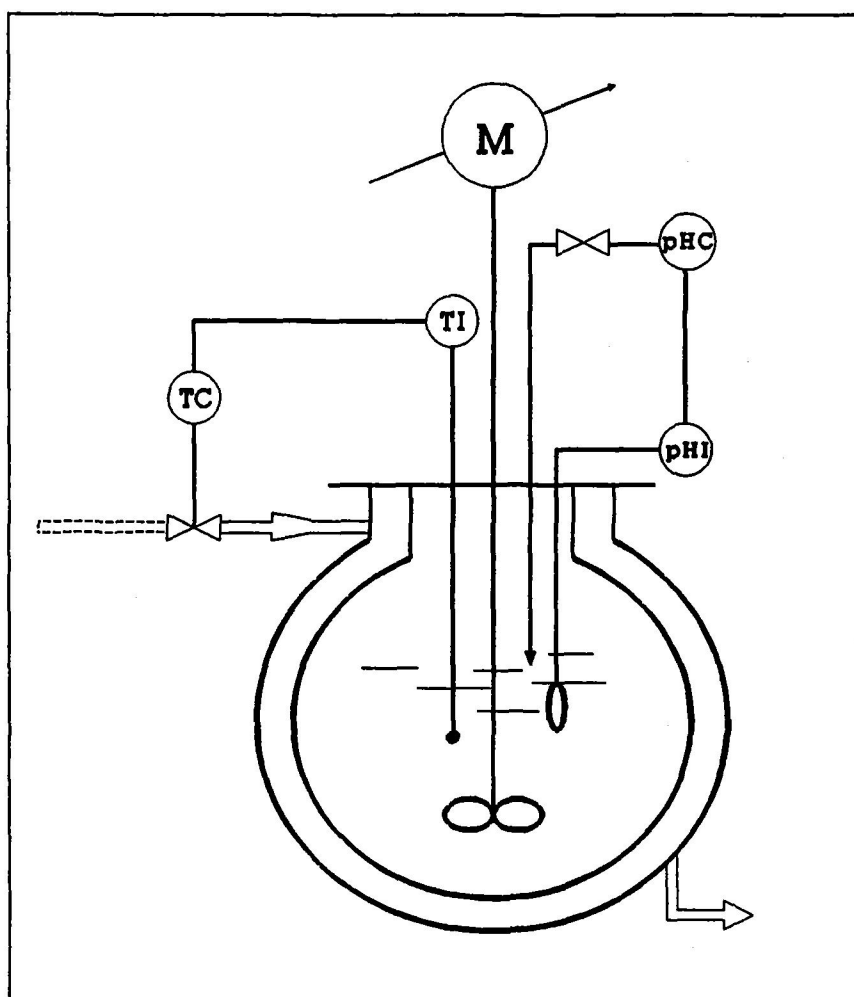


Figura 3.11 Dispositivo experimental

Un reactor encamisado de 250 mL de capacidad, con tapa separable provista de cinco bocas esmeriladas por las cuales se introduce el agitador, un termómetro, el electrodo de pH y una bureta.

El agitador es una varilla acabada en ancla, accionada por un motor eléctrico a velocidad constante en todos los experimentos. El sistema se completa mediante un agitador magnético con lo que se consigue una buena mezcla en el reactor.

Electrodo de pH, marca Ingold y pHmetro CRISON con una precisión de ± 0.01 unidades.

La suspensión de lactoalbúmina se prepara calentando agua destilada a una temperatura próxima a la de trabajo, y se va añadiendo poco a poco el sustrato necesario, agitando para evitar la formación de grumos. Una vez preparada la suspensión, se ajusta el pH con NaOH 2 N, se espera unos minutos hasta conseguir la temperatura deseada, se añade la enzima y comienza la hidrólisis. A las concentraciones de sustrato utilizadas si bien no se consigue una disolución verdadera y transparente, la emulsión obtenida es bastante estable, permaneciendo las partículas en suspensión sin necesidad de ningún tipo de agitación.

Bajo condiciones neutras o ligeramente alcalinas, la disociación de grupos aminos es significativa, por lo que se puede utilizar el método del pH-estado para seguir la cinética del proceso. El control del pH ha de ser continuo y no muy distanciado en el tiempo, pues las disoluciones de proteínas presentan una gran capacidad buffer, y si no se añade continuamente base, el pH bajaría inicialmente pero se estabilizaría por si mismo, en un rango ligeramente ácido. Por ello se ha normalizado la adición de base NaOH 2 N. Una vez comenzada la hidrólisis, al añadir la enzima, se espera a que el pH baje una décima y se añade la base necesaria para llevarlo a su valor inicial. El proceso se continúa hasta que la velocidad de la hidrólisis desciende considerablemente, generalmente a las 3 h. Por tanto el pH nunca varía considerablemente, lo que también favorece la actuación de la enzima.

Para comparar los datos de hidrólisis obtenidos mediante el método del pH-estado en algunos experimentos se tomaron alícuotas de 1 mL y en ellas se determinó el DH mediante el método del TNBS, algunos de estos datos se muestran en la tabla 3.10. En otros experimentos se han tomado muestras en las que tras desnaturalizar la enzima a 100°C durante 5 min, se utilizaron para la determinación de la distribución de tamaños moleculares mediante la técnica de HPLC ya descrita.

3.4 ULTRAFILTRACION DE LOS HIDROLIZADOS

El equipo de flujo tangencial utilizado para la ultrafiltración de los hidrolizados es Minisette System de Filtron, figura 3.12. Las membranas empleadas permiten cortes moleculares de 1 kDa y 10 kDa y pertenecen a la serie Omega de Filtron. Tienen un área de 0.07 m².

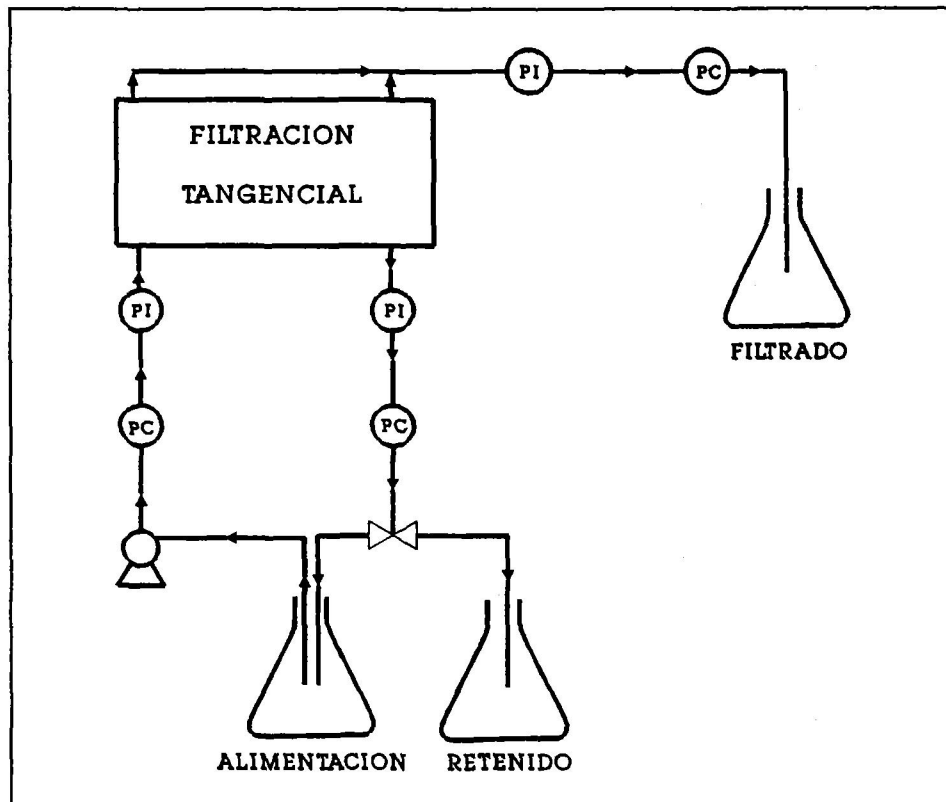


Figura 3.12 Dispositivo de ultrafiltración

Para optimizar el proceso de filtración tangencial se debe determinar el caudal de retenido óptimo (con el filtrado cerrado) y la presión transmembrana óptima (a caudal retenido constante), TMP, que se calcula

$$TMP = \frac{P_e + P_s}{2} - P_f \quad [3.7]$$

donde

P_e = Presión de entrada

P_s = Presión del retenido

P_f = Presión en el manómetro del filtrado

Cuando el filtrado está cerrado la $TMP=0$, por lo tanto

$$P_f = \frac{P_e + P_s}{2} \quad [3.8]$$

Esta expresión nos indica el estado de la membrana, ya que la presión que marca el manómetro en el lado del filtrado debe cumplir la ecuación [3.8].

Las pruebas realizadas para la membrana de corte 10 kDa con agua y un hidrolizado de un grado de hidrólisis del 12 % aproximadamente se recogen en las figuras 3.13 a 3.15.

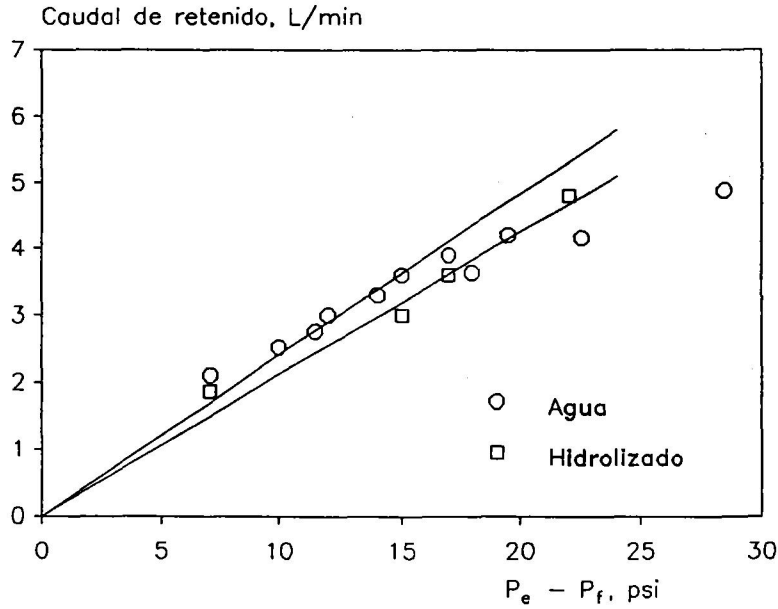


Figura 3.13

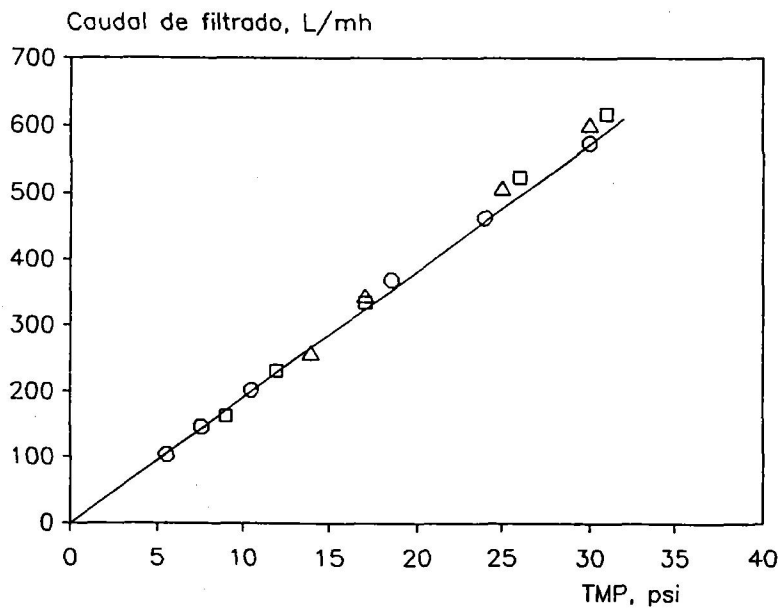


Figura 3.14 AGUA: (o) $\Delta P = 8$ psi; (□) $\Delta P = 12$ psi; (△) $\Delta P = 18$ psi

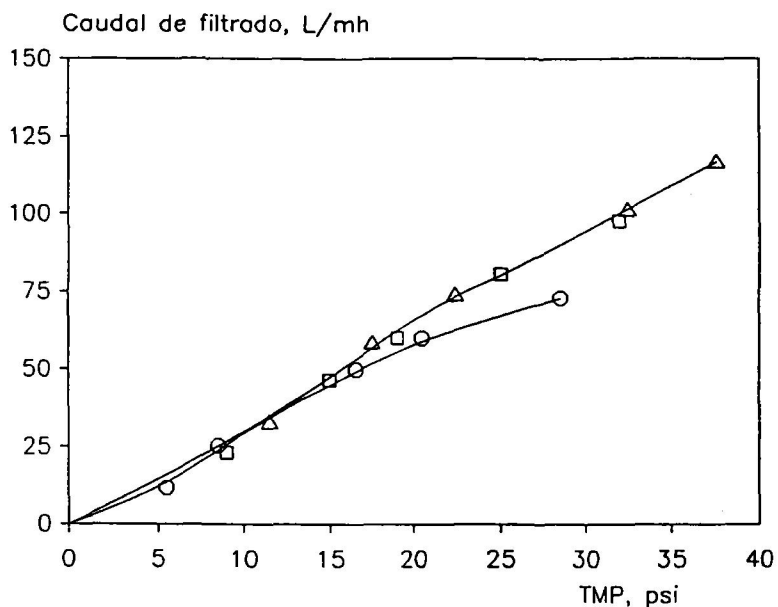


Figura 3.15 HIDROLIZADO: (o) $\Delta P = 7$ psi; (\square) $\Delta P = 12$ psi; (Δ) $\Delta P = 15$ psi

De ellas se deduce que las condiciones óptimas para filtración con la membrana de 10 kDa son $\Delta P = 15$ psi, $P_e = 45$ psi, $P_s = 30$ psi, $P_f = 0$, lo que nos permite filtrar a una velocidad superior a 100 mL/min, figura 3.16.

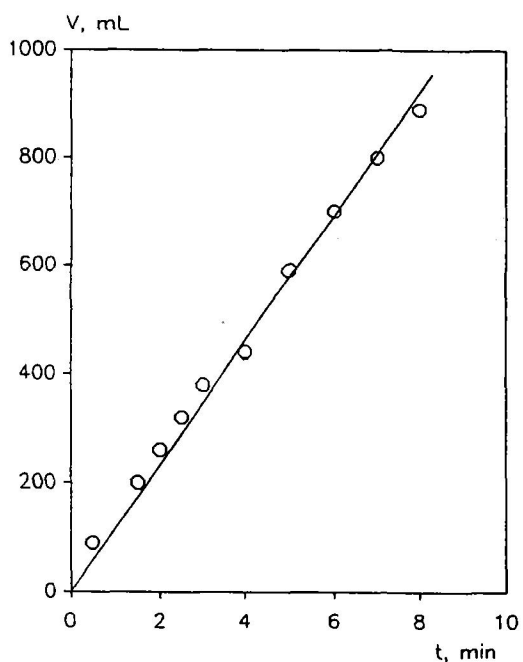


Figura 3.15 Membrana 10 kDa

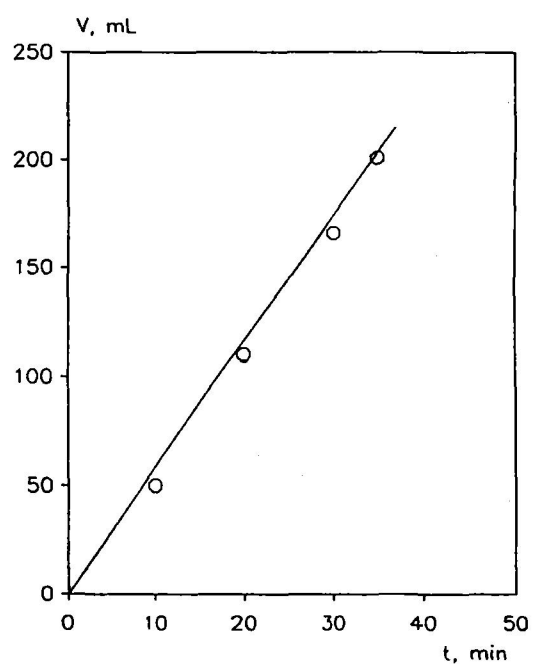


Figura 3.17 Membrana 1 kDa

La membrana de 1 kDa se utilizó para hidrolizados previamente ultrafiltrados por 10 kDa. Sus condiciones óptimas son $TMP=22.5$ psi, $P_o=34$ psi, $P_s=11$ psi, $P_r=0$. Como se puede observar en la figura 3.17 la velocidad de filtración decrece considerablemente.

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES



Se ha estudiado experimentalmente la hidrólisis enzimática de Lactoalbúmina 75 L, libre de lactosa con un contenido medio en proteína del 73 % y un 6 % de humedad, utilizando los siguientes complejos enzimáticos:

- Protease 660 L de MKC
- Alcalasa 0.6 L de Novo
- P.E.M. 2500 S de Novo

los dos primeros de origen bacteriano (*Bacillus*) y el tercero una mezcla de enzimas pancreáticas purificadas de origen bovino y porcino. Todos los experimentos fueron realizados a 50°C y pH=8.0, condiciones de máxima actividad-estabilidad de los complejos enzimáticos utilizados.

También se han realizado algunos experimentos puntuales de hidrólisis enzimática en otras condiciones de operación o utilizando otras enzimas o combinaciones de las mismas que se describen en el apartado 4.3.

4.1 CINÉTICA DE LA HIDROLISIS

En los experimentos realizados se seguía la cinética de la hidrólisis por el consumo de base necesario para mantener constante el pH, tal como se indica en la parte 3 de esta Memoria en la que además se compara este procedimiento con el método del TNBS que también se aplicó en muchos de los experimentos. De esta forma para cada tiempo de operación se obtiene la conversión, x , ó grado de hidrólisis expresado en tanto por 1.

Los valores de las variables de operación ensayadas se indican en la tabla 4.1 y los resultados experimentales, tiempo-conversión, en las tablas 4.2 a 4.8 para el sistema Lactoalbúmina - Protease, en las tablas 4.9 a 4.13 para el sistema Lactoalbúmina - Alcalasa y en las tablas 4.14 a 4.20 para el sistema Lactoalbúmina - P.E.M.

Tabla 4.1
Experimentos realizados

Enzima	e_0 , UA/L	s_0 , g/L	Tabla
Protease 660 L	2.475	38.45	4.2
	3.300	38.45	4.3
	4.950	38.45	4.4
	3.300	81.16	4.5
	4.950	81.16	4.6
	3.300	128.91	4.7
	4.950	128.91	4.8
Alcalasa 0.6 L	1.59	38.45	4.9
	3.18	38.45	4.10
	6.36	38.45	4.11
	3.18	18.73	4.12
	3.18	81.16	4.13
P.E.M. 2500 S	1.58	38.45	4.14
	3.94	38.45	4.15
	8.06	38.45	4.16
	10.50	38.45	4.17
	23.63	38.45	4.18
	8.06	18.73	4.19
	8.06	81.16	4.20

Tabla 4.2
Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
pH=8.0 T=50°C $e_0=2.475$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

<u>t, min</u>	<u>x</u>	<u>t, min</u>	<u>x</u>
1.58	0.0138	35.50	0.0806
3.32	0.0191	42.00	0.0849
4.75	0.0244	50.75	0.0891
6.00	0.0268	58.00	0.0923
7.58	0.0329	66.40	0.0976
8.92	0.0361	77.50	0.1018
9.95	0.0392	88.66	0.1061
11.73	0.0446	103.33	0.1103
13.25	0.0477	116.00	0.1135
15.66	0.0530	125.50	0.1167
17.83	0.0573	140.50	0.1209
20.25	0.0615	152.93	0.1241
22.25	0.0647	169.50	0.1282
24.66	0.0679	192.00	0.1326
27.50	0.0711	215.50	0.1368
30.50	0.0743	240.00	0.1400

Tabla 4.3
Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
pH=8.0 T=50°C $e_0=3.30$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
1.72	0.0211	25.75	0.0829
4.42	0.0341	36.00	0.0910
5.83	0.0423	42.50	0.0975
7.17	0.0455	50.83	0.1008
8.50	0.0488	63.83	0.1073
9.83	0.0536	83.00	0.1154
11.83	0.0585	105.50	0.1219
14.00	0.0634	134.50	0.1284
16.50	0.0683	167.50	0.1349
19.50	0.0715	180.00	0.1382
21.66	0.0764		

Tabla 4.4
Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
pH=8.0 T=50°C $e_0=4.95$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
2.66	0.0341	19.83	0.0861
4.50	0.0439	22.33	0.0926
5.50	0.0504	26.75	0.0991
6.75	0.0553	33.50	0.1056
8.00	0.0601	43.00	0.1122
9.33	0.0650	50.83	0.1187
11.17	0.0699	75.00	0.1252
13.50	0.0764	103.00	0.1333
16.33	0.0813	120.00	0.1382

Tabla 4.5

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

pH=8.0 T=50°C $e_0=3.30$ UA/L $s_0=81.16$ g/L

t, min	x	t, min	x
2.17	0.0108	35.75	0.0524
4.00	0.0154	44.83	0.0570
5.66	0.0185	54.00	0.0616
7.17	0.0216	62.50	0.0662
9.17	0.0246	74.50	0.0708
11.33	0.0285	91.33	0.0762
14.33	0.0323	113.00	0.0808
18.17	0.0362	134.00	0.0862
21.50	0.0393	165.00	0.0908
25.50	0.0439	180.00	0.0939
30.00	0.0470		

Tabla 4.6
Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
pH=8.0 T=50°C $e_0=4.95$ UA/L $s_0=81.16$ g/L

t, min	x	t, min	x
1.55	0.0091	24.66	0.0548
2.50	0.0125	27.66	0.0578
3.57	0.0156	31.17	0.0613
4.75	0.0191	35.17	0.0643
6.08	0.0226	40.00	0.0678
7.25	0.0256	45.17	0.0708
8.92	0.0291	52.58	0.0738
10.42	0.0321	59.92	0.0768
12.17	0.0352	70.16	0.0804
13.83	0.0387	80.83	0.0839
15.66	0.0417	92.75	0.0869
18.50	0.0452	104.83	0.0899
20.00	0.0483	120.00	0.0924
22.33	0.0517		

Tabla 4.7

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

pH = 8.0 T = 50°C $e_0 = 3.30$ UA/L $s_0 = 128.91$ g/L

t, min	x	t, min	x
2.00	0.0053	41.66	0.0364
3.83	0.0078	47.17	0.0388
5.66	0.0102	54.50	0.0422
8.42	0.0136	63.66	0.0451
10.33	0.0150	71.83	0.0485
12.83	0.0175	82.33	0.0514
16.00	0.0204	94.66	0.0548
19.17	0.0228	110.50	0.0587
22.66	0.0252	128.33	0.0616
26.66	0.0281	146.33	0.0654
31.25	0.0310	168.83	0.0693
36.42	0.0339	180.00	0.0713

Tabla 4.8
Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
pH=8.0 T=50°C $e_0=4.95$ UA/L $s_0=128.91$ g/L

t, min	x	t, min	x
1.66	0.0054	34.42	0.0411
2.75	0.0073	37.58	0.0433
4.08	0.0095	41.66	0.0453
6.00	0.0120	43.75	0.0475
7.25	0.0143	49.42	0.0500
9.00	0.0168	53.50	0.0519
11.08	0.0193	58.83	0.0538
13.17	0.0218	62.83	0.0560
15.17	0.243	70.08	0.0576
17.25	0.0266	77.33	0.0601
19.50	0.0291	84.50	0.0620
24.33	0.0332	91.66	0.0643
26.33	0.0355	101.66	0.0665
28.83	0.0373	111.08	0.0680
31.58	0.0393	120.00	0.0702

Tabla 4.9

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

pH = 8.0 T = 50°C $e_0 = 1.59$ UA/L $s_0 = 38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
0.87	0.0050	24.00	0.0569
1.62	0.0084	29.66	0.0636
2.17	0.0117	35.17	0.0687
3.60	0.0167	42.42	0.0754
4.75	0.0201	50.25	0.0804
6.00	0.0234	64.00	0.0888
7.42	0.0268	84.00	0.0955
9.75	0.0335	107.83	0.1038
12.33	0.0385	131.50	0.1122
15.17	0.0435	167.50	0.1189
18.50	0.0502	180.00	0.1223

Tabla 4.10
Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L
pH=8.0 T=50°C $e_0=3.18$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
1.50	0.0134	26.50	0.0904
3.17	0.0268	34.00	0.1005
4.25	0.0335	41.92	0.1089
5.75	0.0402	58.42	0.1189
7.42	0.0469	73.00	0.1290
9.00	0.0536	94.83	0.1373
11.33	0.0603	120.00	0.1474
14.08	0.0687	155.17	0.1574
17.58	0.0770	180.00	0.1658
20.67	0.0821		

Tabla 4.11
Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L
pH = 8.0 T = 50°C $e_0 = 6.36$ UA/L $s_0 = 38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
2.58	0.0422	29.00	0.1243
3.67	0.0506	37.75	0.1326
5.00	0.0606	49.00	0.1427
6.17	0.0673	65.17	0.1544
7.80	0.0757	85.33	0.1661
9.67	0.0841	107.00	0.1762
12.00	0.0908	134.33	0.1862
15.05	0.0991	180.00	0.1979
18.42	0.1058		

Tabla 4.12
Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L
pH = 8.0 T = 50°C $e_0 = 3.18$ UA/L $s_0 = 18.73$ g/L

t, min	x	t, min	x
2.73	0.0387	22.42	0.1177
3.57	0.0490	30.75	0.1281
5.00	0.0593	41.75	0.1418
6.13	0.0662	61.92	0.1521
8.25	0.0799	87.25	0.1659
10.25	0.0868	109.83	0.1762
13.17	0.0971	150.17	0.1899
18.42	0.1109	180.00	0.1968

Tabla 4.13
Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L
pH=8.0 T=50°C $e_0=3.18$ UA/L $s_0=81.16$ g/L

t, min	x	t, min	x
0.78	0.0056	32.92	0.0635
2.92	0.0135	38.83	0.0690
4.82	0.0198	46.25	0.0746
6.22	0.0230	55.50	0.0793
7.58	0.0270	67.17	0.0849
9.53	0.309	84.92	0.0912
11.67	0.0357	106.17	0.0976
14.17	0.0405	129.83	0.1039
20.25	0.0500	159.00	0.1111
23.92	0.0540	180.00	0.1150
27.92	0.0587		

Tabla 4.14

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S
pH=8.0 T=50°C $e_0 = 1.58$ UA/L $s_0 = 38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
1.58	0.0067	38.50	0.0418
3.33	0.0100	52.00	0.0485
5.33	0.0134	64.00	0.0535
9.50	0.0184	80.50	0.0585
13.03	0.0234	101.82	0.0652
16.63	0.0267	131.67	0.0719
21.25	0.0300	166.50	0.0769
25.50	0.0334	180.00	0.0785
31.33	0.0384		

Tabla 4.15
Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S
pH=8.0 T=50°C $e_0=3.94$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
1.07	0.0083	17.75	0.0501
1.87	0.0134	23.00	0.0551
2.60	0.0167	29.33	0.0618
3.88	0.0217	38.25	0.0668
5.00	0.0250	50.25	0.0735
6.17	0.0284	71.17	0.0785
7.67	0.0334	104.33	0.0852
9.33	0.0367	144.50	0.0902
11.33	0.0401	180.00	0.0935
13.58	0.0451		

Tabla 4.16
Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S
pH=8.0 T=50°C $e_0=8.06$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
2.02	0.0250	23.50	0.0750
3.30	0.0350	31.67	0.0817
4.50	0.0400	44.00	0.0867
6.00	0.0467	59.67	0.0917
7.75	0.0517	77.33	0.0984
10.17	0.0583	104.83	0.1034
13.60	0.0633	136.25	0.1100
17.17	0.0683	180.00	0.1150

Tabla 4.17

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

pH = 8.0 T = 50°C $e_0 = 10.50$ UA/L $s_0 = 38.45$ g/L

<u>t, min</u>	<u>x</u>	<u>t, min</u>	<u>x</u>
1.95	0.0300	13.17	0.0717
2.42	0.0333	17.37	0.0767
3.00	0.0367	22.17	0.0833
3.83	0.0433	30.33	0.0884
4.67	0.0467	42.83	0.0950
5.50	0.0500	61.00	0.1000
6.83	0.0567	91.00	0.1067
8.25	0.0600	134.33	0.1150
10.08	0.0650	180.00	0.1200

Tabla 4.18
Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S
pH=8.0 T=50°C $e_0=23.63$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
3.17	0.0534	20.33	0.0969
4.33	0.0618	29.75	0.1035
5.42	0.0668	45.75	0.1102
6.83	0.0718	72.75	0.1186
9.25	0.0802	100.17	0.1236
12.08	0.0852	134.33	0.1319
15.92	0.0918	180.00	0.1386

Tabla 4.19

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

pH=8.0 T=50°C $e_0=8.06$ UA/L $s_0=18.73$ g/L

t, min	x	t, min	x
1.17	0.0344	26.92	0.0928
2.67	0.0482	49.00	0.1031
4.42	0.0619	89.00	0.1100
6.67	0.0688	158.42	0.1203
9.25	0.0756	200.00	0.1237
15.50	0.0859		

Tabla 4.20
Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S
pH=8.0 T=50°C $e_0=8.06$ UA/L $s_0=81.16$ g/L

t, min	x	t, min	x
1.20	0.0111	22.67	0.0516
2.17	0.0167	29.00	0.0563
3.42	0.0214	37.67	0.0611
4.83	0.0262	52.00	0.0658
6.67	0.0309	73.50	0.0714
10.67	0.0381	109.33	0.0777
14.00	0.0428	158.00	0.0833
18.00	0.0468	180.00	0.0865

4.2 DISTRIBUCION DE TAMAÑOS MOLECULARES

Mediante el método de cromatografía líquida de alta presión descrito en la parte 3 de esta Memoria se determinaron las distribuciones de tamaños moleculares en diferentes experimentos cinéticos de los tres sistemas estudiados.

Estas distribuciones expresadas en % de área cromatográfica en función del tiempo y del grado de hidrólisis se indican en las tablas 4.21 y 4.22 para el sistema Lactoalbúmina - Protease, en las tablas 4.23 a 4.27 para el sistema Lactoalbúmina - Alcalasa y en las tablas 4.28 a 4.32 para el sistema Lactoalbúmina - P.E.M.

Tabla 4.21

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

$s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 3.30 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	10-20 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	<1 kDa
15	6.6	6.6	11.5	9.4	5.8	35.6	31.1
30	8.7	5.3	3.1	11.2	4.5	36.7	39.2
45	10.2	4.0	---	11.8	2.9	39.4	41.9
60	11.3	3.3	---	10.3	---	41.8	44.6
120	13.7	3.2	---	6.4	---	45.0	45.4
180	15.0	3.1	---	3.4	---	48.3	47.2

Tabla 4.22

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

$s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 6.60 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	10-20 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	9.5	4.6	---	8.6	---	42.4	44.4
30	12.1	3.8	---	7.4	---	41.0	47.8
45	13.4	3.2	---	5.2	---	41.4	50.2
60	14.7	3.2	---	4.7	---	43.8	48.3
120	17.0	2.5	---	---	---	40.1	57.4
180	18.6	3.1	---	---	---	36.6	60.3

Tabla 4.23

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

$s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 1.59 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	3-20 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	4.4	5.0	10.4	18.2	26.9	39.5
30	6.7	4.2	5.1	18.0	28.2	44.5
45	8.0	3.6	2.6	14.7	31.4	47.7
60	9.2	3.2	2.0	11.5	28.0	55.3
120	10.9	2.1	---	8.5	26.9	62.5
180	13.2	1.7	---	6.3	23.4	68.6

Tabla 4.24

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

 $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 3.18 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	3-20 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	7.0	3.4	5.1	19.4	30.2	41.9
30	9.7	3.2	2.9	12.0	30.6	51.3
45	11.0	1.9	---	7.3	27.8	63.0
60	12.3	1.5	---	5.1	25.4	68.0
120	15.0	0.9	---	---	17.5	81.6
180	17.3	0.8	---	---	9.3	89.9

Tabla 4.25

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

 $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 6.36 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	3-20 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	10.0	1.9	---	11.0	28.9	58.2
30	12.6	1.4	---	6.4	24.3	67.9
45	14.2	1.1	---	1.6	22.1	75.2
60	15.6	1.0	---	---	16.4	82.6
120	19.0	0.8	---	---	8.5	90.7
180	20.3	0.9	---	---	2.9	96.2

Tabla 4.26

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

$s_0 = 18.73 \text{ g/L}$ $e_0 = 3.18 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	3-20 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	10.2	2.0	---	9.2	30.6	58.2
30	13.2	1.8	---	7.0	24.4	66.8
45	15.0	1.2	---	---	18.0	80.8
60	16.3	0.9	---	---	13.9	85.2
120	19.0	1.0	---	---	9.6	89.4
180	20.8	0.8	---	---	3.4	95.8

Tabla 4.27

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

$s_0 = 81.16 \text{ g/L}$ $e_0 = 3.18 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	3-20 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	4.1	5.5	12.3	19.1	28.1	35.0
30	6.3	4.6	7.5	18.5	28.5	40.9
45	7.5	3.5	4.6	15.9	28.4	47.6
60	8.7	2.9	3.5	11.2	29.8	52.6
120	10.7	2.2	---	8.7	28.7	60.4
180	12.0	1.8	---	5.0	25.6	67.6

Tabla 4.28

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

 $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 1.58 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	10-20 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	2.8	7.5	17.5	15.7	18.0	17.8	23.5
30	3.8	5.1	16.4	12.3	13.7	26.8	25.7
45	4.7	4.6	7.5	10.4	11.7	34.8	31.0
60	5.4	3.8	6.7	8.7	11.3	36.5	33.0
120	6.9	3.6	3.0	8.0	7.8	46.0	31.6
180	8.2	3.4	---	7.4	---	54.8	34.4

Tabla 4.29

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

 $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 8.06 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	10-20 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	6.8	3.3	---	7.5	---	54.3	34.9
30	8.5	3.0	---	4.5	---	55.8	36.7
45	9.4	2.9	---	2.8	---	53.8	40.5
60	10.3	2.9	---	1.7	---	52.3	43.1
120	11.8	2.9	---	---	---	38.0	59.1
180	12.9	2.9	---	---	---	37.0	60.1

Tabla 4.30

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

$s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 23.63$ UA/L

% en áreas de los cromatogramas

t,min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	10-20 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	9.2	3.7	---	2.1	---	57.3	36.9
30	10.8	3.2	---	1.5	---	53.4	41.9
45	11.5	2.7	---	1.8	---	50.7	44.8
60	12.1	2.5	---	---	---	47.3	50.2
120	13.6	2.9	---	---	---	30.5	66.6
180	14.6	3.1	---	---	---	29.8	67.1

Tabla 4.31

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

$s_0 = 18.73$ g/L $e_0 = 8.06$ UA/L

% en áreas de los cromatogramas

t,min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	10-20 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	8.6	2.3	1.0	4.1	---	56.6	36.0
30	9.8	2.3	---	1.4	---	55.8	40.5
45	10.7	2.4	---	1.1	---	55.4	41.1
60	11.3	2.2	---	0.3	---	50.3	47.2
120	12.4	2.4	---	---	---	46.6	51.0
180	13.2	2.4	---	---	---	38.4	59.2

Tabla 4.32

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

 $s_0 = 81.16 \text{ g/L}$ $e_0 = 8.06 \text{ UA/L}$

% en áreas de los cromatogramas

t,min	DH, %	40-70 kDa	20-40 kDa	10-20 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
15	4.3	6.7	11.2	6.6	12.4	38.7	24.4
30	5.3	2.7	7.2	6.8	11.5	40.3	31.5
45	6.3	2.5	3.0	9.7	10.3	41.6	32.9
60	6.8	2.2	---	7.5	---	55.4	34.9
120	8.1	2.2	---	1.7	---	60.9	35.2
180	8.8	2.2	---	---	---	61.6	36.2

4.3 OTROS EXPERIMENTOS

4.3.1 Influencia de la mezcla de enzimas

En las tablas 4.33 a 4.35 se recogen los datos obtenidos en experimentos donde se mezclaron enzimas de origen animal y bacteriano.

4.3.2 Influencia del pH

Los experimentos realizados a $\text{pH} = 9.0$ y $\text{pH} = 10.0$ se indican en las tablas 4.36 y 4.37

4.3.3 Influencia de la temperatura

Las tablas 4.38 y 4.39 muestran los experimentos realizados a 60°C y 70°C respectivamente.

Tabla 4.33

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L + P.E.M. 2500 S
pH=8.0 T=50°C $e_0 = (49.5 + 15.6)$ UA/L $s_0 = 109.5$ g/L

t, min	x	t, min	x
6.83	0.0914	57.00	0.1617
8.83	0.1014	83.00	0.1722
11.17	0.1115	113.83	0.1818
14.83	0.1215	164.00	0.1970
21.17	0.1338	206.00	0.2050
28.67	0.1416	240.00	0.2120
41.17	0.1538		

Tabla 4.34

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L + P.E.M. 2500 S
 pH=8.0 T=50°C $e_0 = (99 + 15.6)$ UA/L $s_0 = 109.5$ g/L

t, min	x	t, min	x
6.17	0.1191	35.00	0.1795
8.00	0.1291	49.33	0.1885
10.50	0.1413	67.66	0.2005
13.75	0.1502	86.50	0.2062
18.25	0.1580	114.67	0.2186
25.17	0.1670	149.50	0.2290

Tabla 4.35

Mezclas Protease 660 L y P.E.M. 2500 S
 Distribución de tamaños moleculares, $e_0/s_0 = 1.047$ UA/g

% en áreas de los cromatogramas

t, min	DH, %	55000 Da	17000 Da	< 3000 Da
30	17.3	1.25	0.35	98.40
60	19.5	0.40	0.05	99.55
120	22.4	0.35	0.03	99.62

Tabla 4.36
Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
pH=9.0 T=50°C $e_0 = 3.30$ UA/L $s_0 = 38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
0.83	0.0129	25.67	0.0869
2.00	0.0182	29.33	0.0923
2.67	0.0236	33.33	0.0955
4.25	0.0311	38.33	0.0998
5.33	0.0354	44.00	0.1030
6.67	0.0408	48.17	0.1062
8.17	0.0472	54.00	0.1116
9.75	0.0515	62.17	0.1159
11.17	0.0558	71.17	0.1202
12.58	0.0601	79.42	0.1245
14.67	0.0654	86.17	0.1288
16.58	0.0708	93.67	0.1330
18.50	0.0730	101.00	0.1373
20.17	0.0773	108.33	0.1416
23.00	0.0826	117.00	0.1460

Tabla 4.37

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

pH = 10.0 T = 50°C $e_0 = 3.30$ UA/L $s_0 = 38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
2.00	0.0214	28.13	0.1101
3.66	0.0306	32.00	0.1162
4.66	0.0397	37.66	0.1223
6.04	0.0459	44.66	0.1314
7.42	0.0520	51.50	0.1376
9.00	0.0611	61.17	0.1467
12.50	0.0734	72.66	0.1528
14.83	0.0825	84.17	0.1590
17.50	0.0887	100.00	0.1681
20.17	0.0948	117.85	0.1742
23.92	0.1039		

Tabla 4.38
Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
pH=8.0 T=60°C $e_0=3.30$ UA/L $s_0=38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
3.20	0.0392	25.75	0.1192
4.43	0.0523	30.55	0.1257
5.00	0.0572	36.25	0.1323
5.93	0.0637	44.04	0.1388
6.83	0.0686	55.48	0.1502
8.22	0.0784	72.17	0.1584
9.77	0.0849	89.42	0.1649
11.50	0.0915	107.25	0.1698
13.68	0.0980	121.45	0.1747
15.97	0.1045	139.33	0.1829
18.63	0.1094	177.50	0.1894
21.25	0.1143	180.00	0.1911

Tabla 4.39

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

pH = 8.0 T = 70°C $e_0 = 3.30$ UA/L $s_0 = 38.45$ g/L

t, min	x	t, min	x
2.83	0.0603	20.08	0.1365
3.83	0.0714	25.58	0.1461
4.57	0.0778	31.45	0.1524
5.25	0.0842	38.17	0.1604
6.17	0.0905	48.08	0.1683
7.33	0.0984	64.17	0.1762
8.42	0.1048	87.00	0.1874
10.00	0.1111	105.83	0.1953
11.66	0.1175	131.00	0.2016
13.66	0.1238	154.50	0.2096
16.66	0.1302	180.00	0.2159

5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

5.1 CINETICA DE LA HIDROLISIS

5.1.1 Sistema Lactoalbúmina - Protease 660 L

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con este sistema, que se indican en las tablas 4.2 a 4.8 se han representado en las figuras 5.1 a 5.3.

En la figura 5.1 se representa la conversión frente al tiempo de hidrólisis para los experimentos realizados con una concentración de proteína de 38.45 g/L y diferentes concentraciones iniciales de enzima. En las figuras 5.2 y 5.3 se realiza la misma representación para las concentraciones de enzima de 3.30 y 4.95 UA/L respectivamente, variando en cada una de ellas la concentración de proteína.

En todos los casos se observa que la velocidad de hidrólisis disminuye apreciablemente con el tiempo y parece que la conversión tiende a un valor límite función de las concentraciones iniciales de sustrato y enzima. Dado que los valores de la conversión obtenidos están muy lejos de la hidrólisis total de la proteína, esta disminución de velocidad de hidrólisis sólo puede ser debido a tres causas:

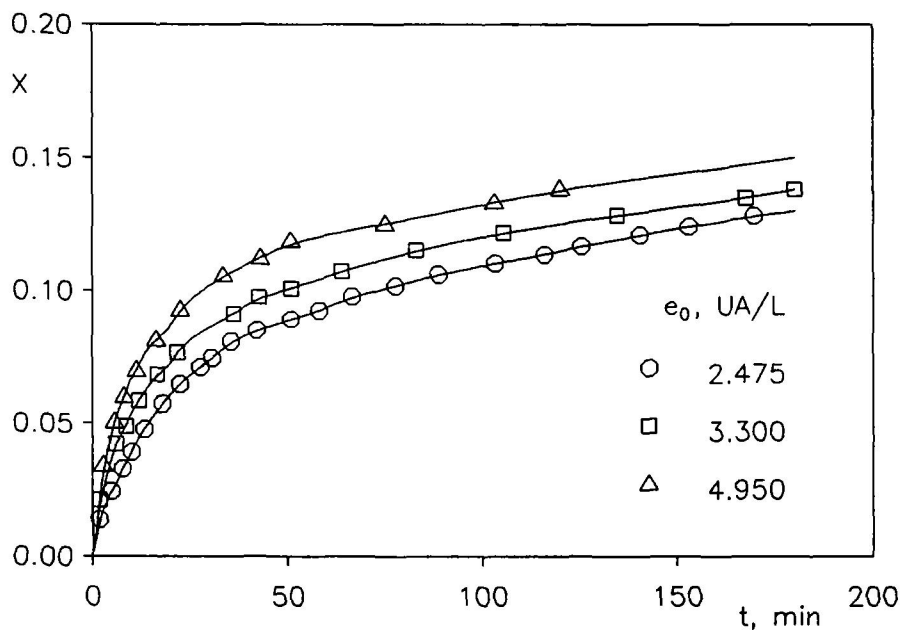


Figura 5.1 Protease 660 L: $s_0 = 38.45$ g/L

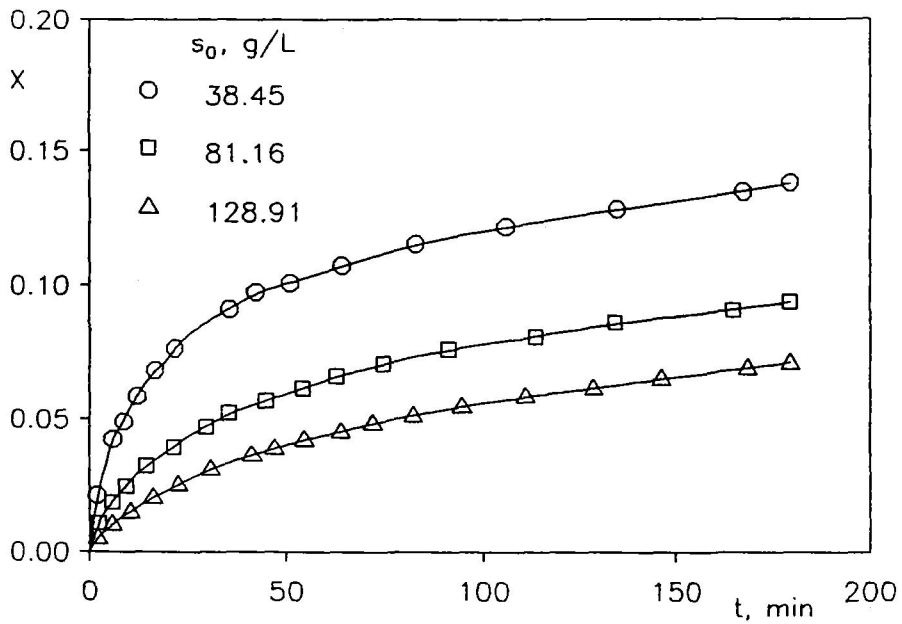


Figura 5.2 Protease 660 L: $e_0 = 3.30$ UA/L

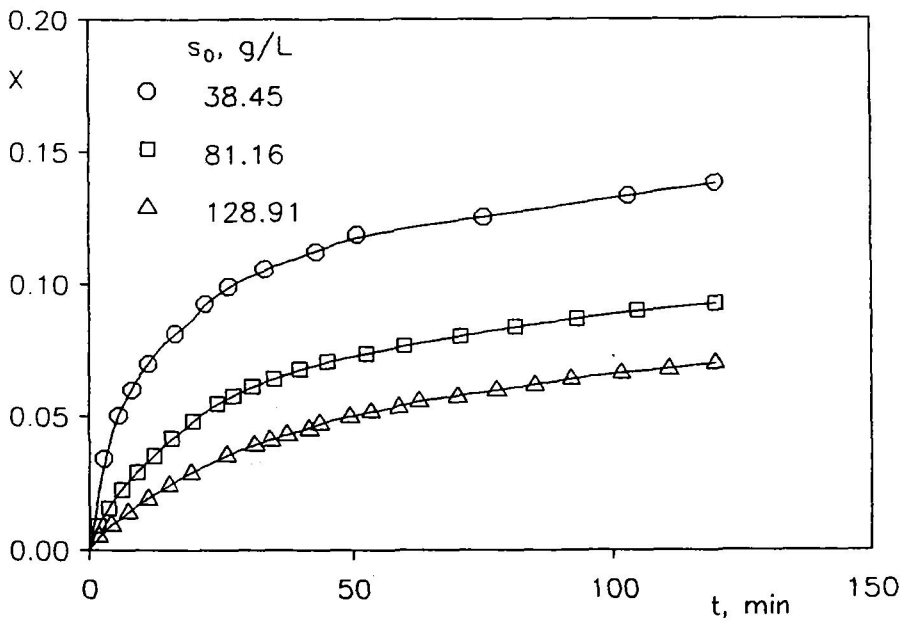


Figura 5.3 Protease 660 L: $e_0 = 4.95$ UA/L

- a) disminución de la concentración de enlaces peptídicos susceptibles de ser hidrolizados
- b) inhibición enzimática por los productos de reacción
- c) desnaturalización de la enzima o formación irreversible de complejos muertos en los que intervenga la enzima

La primera causa debería hacer tender las curvas x-t hacia un límite común determinado por la concentración de enlaces peptídicos susceptibles de ser hidrolizados en el sustrato original, hecho que no se observa en estas figuras.

La tercera causa se trata usualmente en la cinética enzimática utilizando ecuaciones potenciales para la velocidad de desaparición de la concentración de enzima activa

$$-\frac{de}{dt} = k_d \cdot e^n \quad [5.1]$$

la integración de esta ecuación conduce a:

$$e = e_0 \exp(-k_d \cdot t) \quad \text{para } n=1 \quad [5.2]$$

$$e = \left[e_0^{1-n} + (n-1) k_d \cdot t \right]^{\frac{1}{1-n}} \quad \text{para } n \neq 1 \quad [5.3]$$

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

$$r = s_0 \frac{dx}{dt} = f(s_0, x, c_j) \cdot e \quad [5.4]$$

donde c_j 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 la ecuación [5.4] e integrando se obtiene

$$s_0 \int_0^x \frac{dx}{f(s_0, x, c_j)} = \int_0^t e \cdot dt \quad [5.5]$$

que pone de manifiesto que para unas condiciones iniciales dadas la conversión obtenida dependerá del valor de la integral del segundo miembro, Camacho *et al.* (1985). Si no se produce desnaturalización enzimática se tendrá

$$\int_0^t e \cdot dt = e_0 \cdot t \quad [5.6]$$

para una desnaturalización de primer orden utilizando la ecuación [5.2]

$$\int_0^t e \cdot dt = \frac{e_0}{k_d} [1 - \exp(-k_d \cdot t)] \quad [5.7]$$

para $n=2$

$$\int_0^t e \cdot dt = \frac{1}{k_d} \ln(1 + k_d \cdot e_0 \cdot t) \quad [5.8]$$

para $n \neq 1$ y $n \neq 2$

$$\int_0^t e \cdot dt = \frac{e_0^{2-n}}{(2-n) k_d} \left[1 - (1 - (1-n) e_0^{n-1} \cdot k_d \cdot t)^{\frac{2-n}{1-n}} \right] \quad [5.9]$$

Con objeto de comprobar estas ecuaciones en la figura 5.4 se representa la conversión frente al producto $e_0 \cdot t$ como variable intensiva del tratamiento enzimático. Se observa en esta figura que los experimentos de la misma concentración de sustrato se reúnen en una sola línea independientemente de su concentración inicial de enzima, lo que únicamente está de acuerdo con las ecuaciones [5.6] y [5.8].

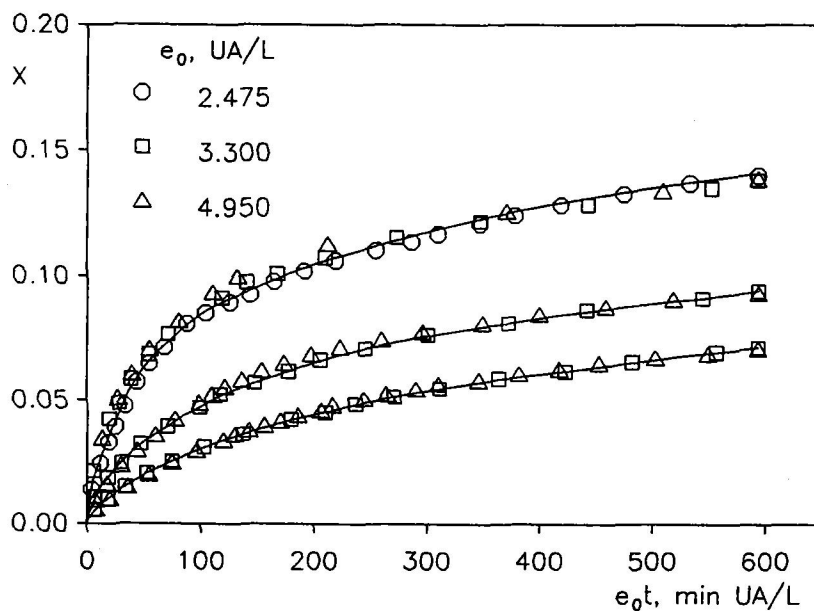


Figura 5.4 Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

Este resultado pone de manifiesto que o no se produce desnaturalización enzimática o ésta es de segundo orden.

Con objeto de comprobar la segunda causa y para la interpretación cinética de los resultados obtenidos sería conveniente evaluar la velocidad de hidrólisis para diferentes valores de la conversión, es decir, diferenciar los datos primarios obtenidos. Con este fin se han utilizado funciones spline cúbicas para el ajuste de los resultados experimentales, Klaus y Van Ness (1967), seleccionando los nodos de manera que correspondan a intervalos iguales de la variable dependiente, x , y el número de nodos de forma que se minimice el sumatorio de los cuadrados residuales

$$SSR = \frac{\sum (x_{\text{cal}} - x_{\text{exp}})^2}{M - N} \quad [5.10]$$

donde M es el número de parejas de datos y N el número de nodos, Tao y Watson (1988). El algoritmo utilizado y el programa en pascal del mismo se indican en el apéndice, apartado 9.1.

En las tablas 5.1 y 5.2 se indican los valores obtenidos mediante este método para dx/dt a diferentes valores de x en los dos experimentos extremos de mayor conversión ($s_0 = 38.45$ g/L; $e_0 = 4.95$ UA/L) y de menor conversión ($s_0 = 128.91$ g/L; $e_0 = 3.30$ UA/L) respectivamente, a título de ejemplo. Los resultados obtenidos para los otros experimentos de este sistema se indican en las tablas 9.1 a 9.5 del apéndice, apartado 9.2.

De acuerdo con la ecuación [5.4] para una concentración inicial de sustrato dada, el valor de dx/dt debe ser función exclusivamente de la conversión y de la concentración de enzima activa. Como la concentración de enzima activa en cada instante dependerá exclusivamente de su concentración inicial y del tiempo, y también de la concentración inicial de sustrato y de la conversión si los péptidos participan en el proceso de desnaturalización, resulta que para cada experimento dx/dt debe ser una función exclusiva de la conversión, ya que existe una relación unívoca entre ésta y el tiempo

$$\frac{dx}{dt} = F(x) \quad [5.11]$$

De las relaciones funcionales ensayadas para la expresión anterior la que mejor reproduce nuestros resultados experimentales es la indicada en las figuras 5.5 a 5.7 en las que se representa $\log(dx/dt)$ frente a x . En estas figuras se observa que los resultados experimentales parecen ajustarse a una relación funcional de la forma

Tabla 5.1

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 4.950$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
2.83	0.035	0.005469
3.73	0.040	0.005622
4.62	0.045	0.005499
5.57	0.050	0.005072
6.63	0.055	0.004361
7.88	0.060	0.003658
9.38	0.065	0.003039
11.16	0.070	0.002615
13.21	0.075	0.002287
15.55	0.080	0.001992
18.23	0.085	0.001763
21.21	0.090	0.001601
24.51	0.095	0.001430
28.25	0.100	0.001241
32.66	0.105	0.001027
38.18	0.110	0.000795
45.67	0.115	0.000554
57.13	0.120	0.000353
73.02	0.125	0.000287
91.42	0.130	0.000265
109.57	0.135	0.000294

Tabla 5.2

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 128.91$ g/L $e_0 = 3.30$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
5.49	0.010	0.001226
10.06	0.015	0.000980
15.70	0.020	0.000821
22.17	0.025	0.000724
29.68	0.030	0.000611
38.69	0.035	0.000504
49.66	0.040	0.000417
62.54	0.045	0.000363
77.37	0.050	0.000313
95.08	0.055	0.000252
118.17	0.060	0.000190
145.33	0.065	0.000190
172.25	0.070	0.000171

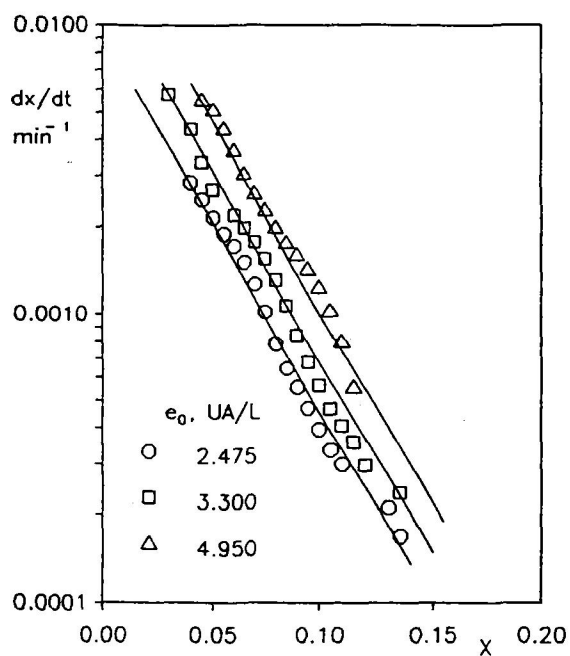


Figura 5.5 Protease 660 L: $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$

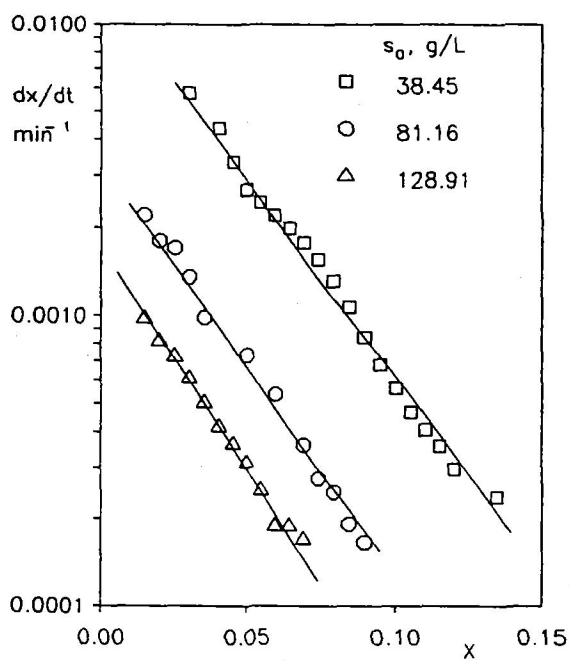


figura 5.6 Protease 660 L: $e_0 = 3.30 \text{ UA/L}$

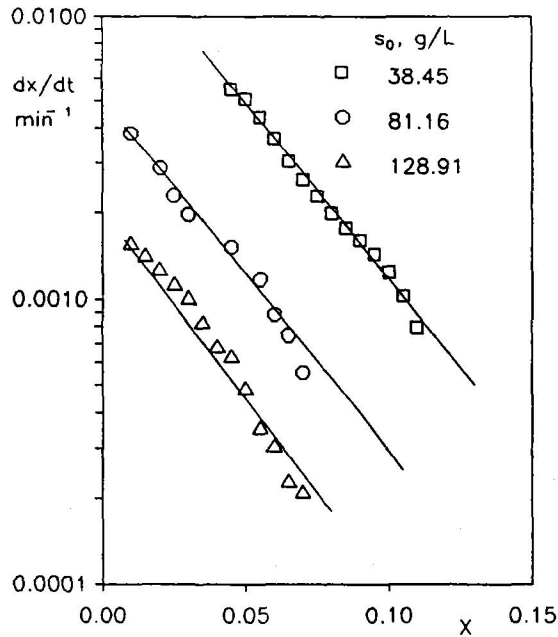


Figura 5.7 Protease 660 L: $e_0 = 4.95 \text{ UA/L}$

$$\frac{dx}{dt} = a \exp(-b \cdot x) \quad [5.12]$$

el valor de b parece ser aproximadamente constante mientras que el valor de a aumenta con la concentración inicial de enzima, figura 5.5, y disminuye de manera importante al aumentar la concentración inicial de sustrato, figuras 5.6 y 5.7.

Separando variables e integrando la ecuación [5.12] se obtiene

$$\frac{1}{b} [\exp(b \cdot x) - 1] = a \cdot t \quad [5.13]$$

o en forma explícita para x

$$x = \frac{1}{b} \ln (1 + a \cdot b \cdot t) \quad [5.14]$$

ecuación que permite determinar los mejores valores de los parámetros cinéticos a y b por regresión no lineal, eliminando así los errores inherentes al cálculo de las derivadas en el método diferencial. Con esta finalidad se ha preparado un programa de regresión no lineal mediante el algoritmo de Marquardt que se indica en el apéndice, apartado 9.3. Los valores obtenidos de estos parámetros en función de la concentración inicial de sustrato y de enzima se indican en la tabla 5.3

Tabla 5.3
Lactoalbúmina - Protease 660 L
Valores de los parámetros cinéticos de la ecuación [5.14]

s_0 , g/L	e_0 , UA/L	a , min ⁻¹	b	a_m , min ⁻¹
38.45	2.48	0.0080	28.79	0.0102
38.45	3.30	0.0152	32.53	0.0157
38.45	4.95	0.0238	32.03	0.0253
81.16	3.30	0.0043	36.10	0.0040
81.16	4.95	0.0054	29.59	0.0059
128.91	3.30	0.0019	37.05	0.0018
128.91	4.95	0.0026	35.03	0.0025

Se observa en esta tabla que como se apreciaba en las figuras 5.5 a 5.7 el valor de b es prácticamente constante oscilando alrededor de un valor medio por lo que se ha calculado éste que resulta

$$b_m = 33.0 \quad [5.15]$$

con este valor se han recalculado los correspondientes al parámetro a , promediando los obtenidos para cada punto experimental, que se indican también en la última columna de la tabla 5.3. Estos valores medios permiten reproducir de forma aceptable los resultados experimentales obtenidos como se observa a título de ejemplo en las tablas 5.4 y 5.5 correspondientes a los dos experimentos seleccionados anteriormente. Los valores recalculados para los restantes experimentos de este sistema se encuentran en las tablas 9.14 a 9.18 del apéndice, apartado 9.4.

Los valores del parámetro a_m indicados en la tabla 5.3 aumentan con la concentración inicial de enzima y disminuyen con la concentración inicial de sustrato como ya se había comentado al observar las figuras 5.5 a 5.7. Por esta razón en la figura 5.8 se representan los valores de a_m obtenidos frente a la concentración inicial de enzima.

Tabla 5.4
Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 4.950$ UA/L
Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.66	0.0341	0.0354
4.50	0.0439	0.0473
5.50	0.0504	0.0522
6.75	0.0553	0.0573
8.00	0.0601	0.0618
9.33	0.0650	0.0659
11.17	0.0699	0.0707
13.50	0.0764	0.0760
16.33	0.0813	0.0813
19.83	0.0861	0.0868
22.33	0.0926	0.0902
26.75	0.0991	0.0954
33.50	0.1056	0.1020
43.00	0.1122	0.1093
50.83	0.1187	0.1143
75.00	0.1252	0.1258
103.00	0.1333	0.1353
120.00	0.1382	0.1399

Tabla 5.5

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 128.91$ g/L $e_0 = 3.30$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.00	0.0053	0.0034
3.83	0.0078	0.0062
5.66	0.0102	0.0088
8.42	0.0136	0.0123
10.33	0.0150	0.0145
12.83	0.0175	0.0172
16.00	0.0204	0.0202
19.17	0.0228	0.0230
22.66	0.0252	0.0258
26.66	0.0281	0.0288
31.25	0.0310	0.0318
36.42	0.0339	0.0349
41.66	0.0364	0.0377
47.17	0.0388	0.0405
54.50	0.0422	0.0438
63.66	0.0451	0.0474
71.83	0.0485	0.0504
82.33	0.0514	0.0537
94.66	0.0548	0.0573
110.50	0.0587	0.0613
128.33	0.0616	0.0653
146.33	0.0654	0.0688
168.83	0.0693	0.0728
180.00	0.0713	0.0745

Se puede apreciar en esta figura que parece existir una relación lineal de a_m con e_0 , aunque con una ordenada en el origen negativa, por regresión lineal se obtiene

$$a_m = 0.0070 \cdot e_0 - 0.0071 \quad r^2 = 0.999 \quad [5.16]$$

Puesto que los resultados obtenidos sugieren que el valor del parámetro cinético a_m es inversamente proporcional a la concentración inicial de sustrato, en la figura 5.9 se representan los valores de a_m frente a la relación e_0/s_0 para los siete experimentos realizados. También en este caso se observa una relación lineal con ordenada en el origen negativa

$$a_m = 0.241 \frac{e_0}{s_0} - 0.0060 \quad r^2 = 0.971 \quad [5.17]$$

Con este resultado la ecuación [5.12] queda en la forma

$$\frac{dx}{dt} = \left(0.241 \frac{e_0}{s_0} - 0.0060 \right) \exp(-33 \cdot x) \quad [5.18]$$

y por tanto la velocidad de hidrólisis

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = (0.241e_0 - 0.0060s_0) \exp(-33 \cdot x) \quad [5.19]$$

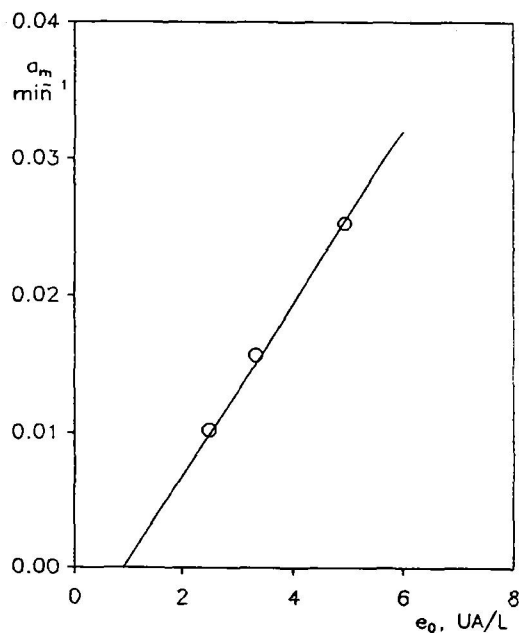


Figura 5.8 Protease 660 L: $s_0 = 38.45$ g/L

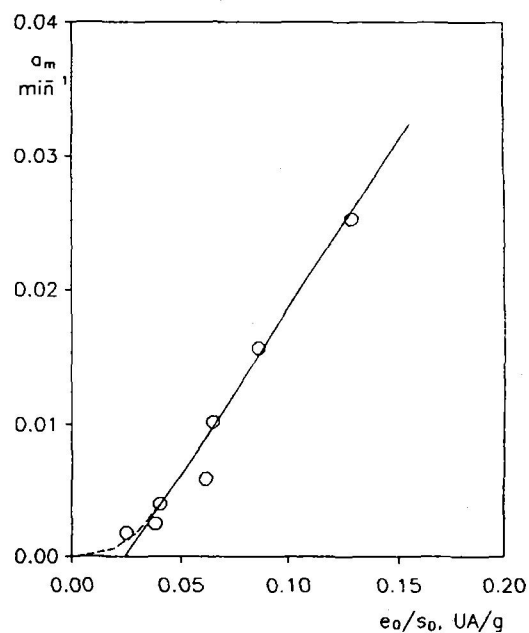


Figura 5.9 Protease 660 L

5.1.2 Sistema Lactoalbúmina - Alcalasa 0.6 L

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con este sistema, que se indican en las tablas 4.9 a 4.13 se han representado en las figuras 5.10 y 5.11.

En la figura 5.10 se representa la conversión frente al tiempo de hidrólisis para los experimentos realizados con una concentración de proteína de 38.45 g/L y diferentes concentraciones de enzima. En la figura 5.11 se realiza la misma representación para la concentración de enzima de 3.18 UA/L variando en cada experimento la concentración de proteína.

Al igual que en el sistema anterior se observa que la velocidad de hidrólisis disminuye apreciablemente con el tiempo y parece que la conversión tiende a un valor límite función de las concentraciones iniciales de enzima y sustrato.

De la misma forma que en el apartado 5.1.1 en la figura 5.12 se representa la conversión frente al producto $e_0 \cdot t$ como variable intensiva del tratamiento enzimático. Se observa en esta figura que los experimentos de la misma concentración de sustrato tiende a reunirse en una sola línea independientemente de la concentración inicial de enzima, como ocurría en el sistema anterior.

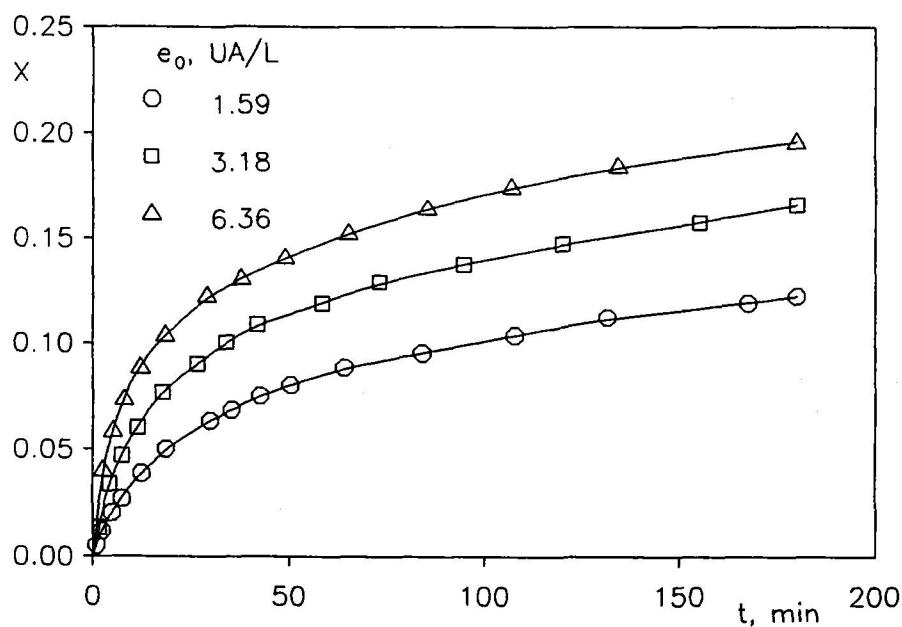


Figura 5.10 Alcalasa 0.6 L: $s_0 = 38.45$ g/L

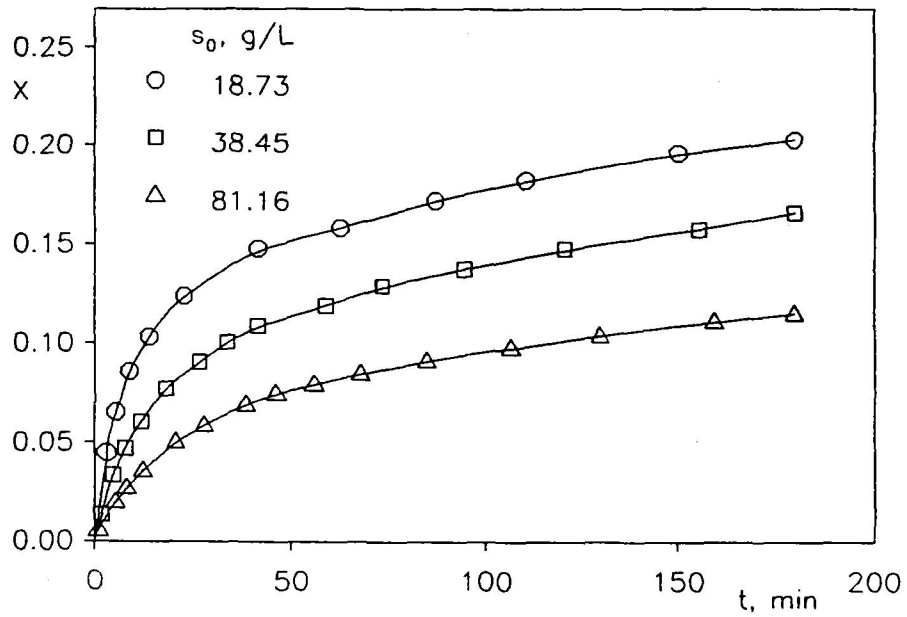


figura 5.11 Alcalasa 0.6 L: $e_0 = 3.18$ UA/L

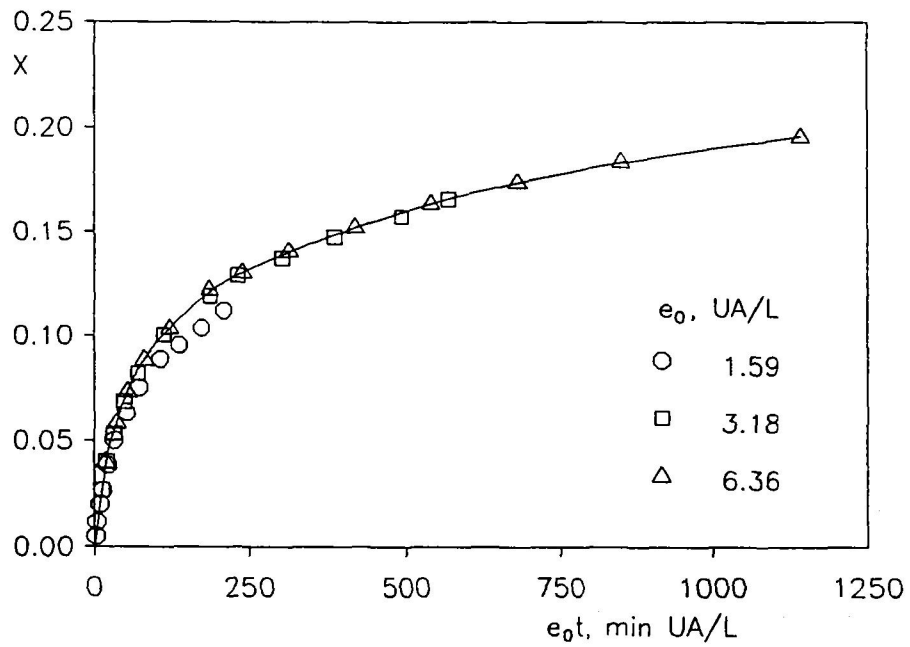


Figura 5.12 Alcalasa 0.6 L: $s_0 = 38.45$ g/L

Para la interpretación cinética de los resultados obtenidos es conveniente evaluar la velocidad de hidrólisis para diferentes valores de la conversión, es decir, diferenciar los datos primarios obtenidos. Para ello, como en el sistema lactoalbúmina - protease 660 L, se han utilizado funciones spline cúbicas para el ajuste de los resultados experimentales. En el apartado 9.1 del apéndice se recoge el programa que realiza estos ajustes y diferencia los datos.

A título de ejemplo, en las tablas 5.6 y 5.7 se indican los valores obtenidos mediante este método para dx/dt a diferentes valores de x en los dos experimentos extremos de mayor conversión ($s_0 = 38.45$ g/L; $e_0 = 6.36$ UA/L) y de menor conversión ($s_0 = 81.16$ g/L; $e_0 = 3.18$ UA/L) respectivamente. Los resultados obtenidos para los otros experimentos de este sistema se indican en las tablas 9.6 a 9.8 del apéndice, apartado 9.2.

De las relaciones funcionales ensayadas para la expresión $dx/dt = F(x)$, la que mejor reproduce nuestros resultados experimentales es la indicada en las figuras 5.13 y 5.14 en las que se representa $\log(dx/dt)$ frente a x . En estas figuras se observa que los resultados experimentales parecen ajustarse a una relación funcional análoga a la del sistema lactoalbúmina - protease 660 L, ecuación [5.12]; el valor de b parece ser aproximadamente constante mientras que el valor de a aumenta con la concentración inicial de enzima, figura 5.13, y disminuye de manera importante al aumentar la concentración inicial de sustrato.

Separando variables, integrando y reordenando la ecuación anterior se obtiene la ecuación [5.14] que permite determinar los mejores valores de los parámetros cinéticos a y b por regresión no lineal, eliminando así los errores inherentes al cálculo de las derivadas en el método diferencial (programa de regresión no lineal, apartado 9.3 del apéndice). Los valores obtenidos de estos parámetros en función de las concentraciones iniciales de enzima y sustrato se muestran en la tabla 5.8.

En esta tabla se observa que, como se apreciaba en las figuras 5.13 y 5.14, el valor de b es prácticamente constante oscilando alrededor de un valor medio

$$b_m = 26.3 \quad [5.20]$$

con este valor se han recalculado los correspondientes al parámetro a , promediando los obtenidos para cada punto experimental, que se indican también en la última columna de la tabla 5.8. Estos valores medios permiten reproducir de forma aceptable los resultados experimentales obtenidos como puede verse en las tablas 5.9 y 5.10 correspondientes a los dos experimentos seleccionados anteriormente. Los valores recalculados para los restantes experimentos de este sistema se recogen en las tablas 9.19 a 9.21 del apéndice, apartado 9.4.

Tabla 5.6

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 6.36$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
2.93	0.045	0.008045
3.57	0.050	0.007634
4.24	0.055	0.007180
4.96	0.060	0.006674
5.75	0.065	0.006101
6.61	0.070	0.005444
7.59	0.075	0.004763
8.73	0.080	0.004090
10.06	0.085	0.003453
11.64	0.090	0.002912
13.48	0.095	0.002572
15.52	0.100	0.002325
17.79	0.105	0.002079
20.35	0.110	0.001840
23.25	0.115	0.001617
26.55	0.120	0.001425
30.28	0.125	0.001256
34.55	0.130	0.001091
39.50	0.135	0.000935
45.28	0.140	0.000804
51.89	0.145	0.000720
59.04	0.150	0.000681
66.60	0.155	0.000641
74.67	0.160	0.000597
83.40	0.165	0.000549
92.98	0.170	0.000495
103.76	0.175	0.000434
116.17	0.180	0.000374
130.70	0.185	0.000317
147.87	0.190	0.000269
167.71	0.195	0.000240

Tabla 5.7

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 81.16$ g/L $e_0 = 3.18$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
3.34	0.015	0.003213
5.01	0.020	0.002831
6.88	0.025	0.002525
8.98	0.030	0.002246
11.33	0.035	0.002009
13.97	0.040	0.001781
16.98	0.045	0.001555
20.44	0.050	0.001338
24.49	0.055	0.001145
29.17	0.060	0.001004
34.42	0.065	0.000901
40.36	0.070	0.000784
47.35	0.075	0.000647
56.08	0.080	0.000506
67.43	0.085	0.000388
81.53	0.090	0.000333
97.44	0.095	0.000298
114.97	0.100	0.000275
133.67	0.105	0.000258
154.24	0.110	0.000225
179.91	0.115	0.000160

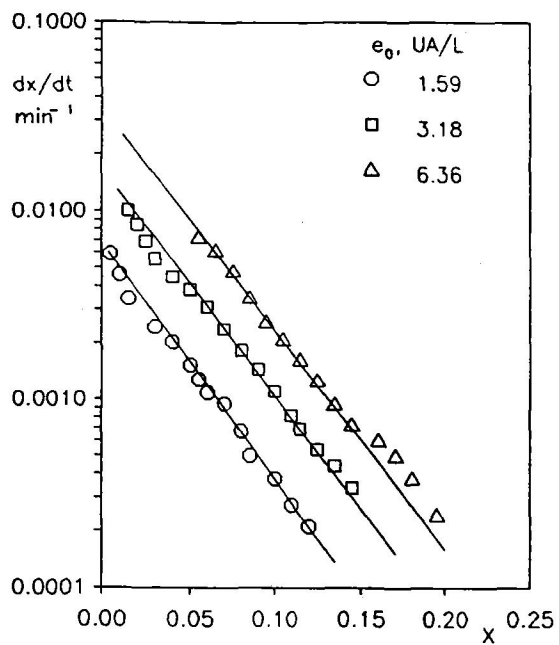


Figura 5.13 Alcalasa 0.6 L: $s_0=38.45$ g/L

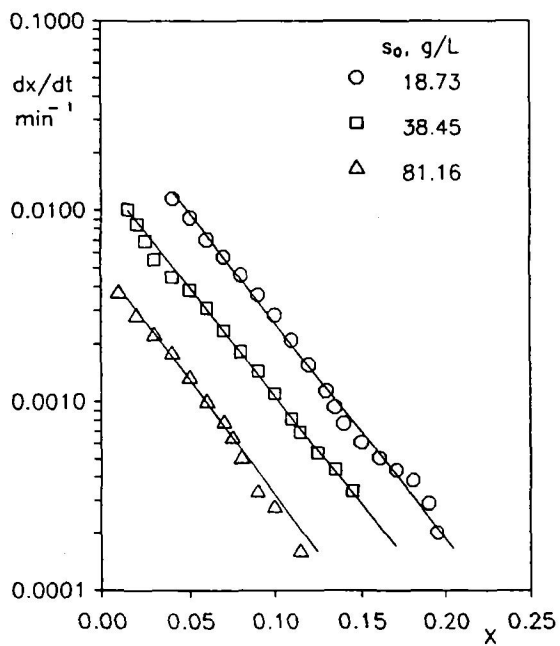


Figura 5.14 Alcalasa 0.6 L: $e_0=3.18$ UA/L

Tabla 5.8
Lactoalbúmina - Alcalasa 0.6 L
Valores de los parámetros cinéticos de la ecuación [5.14]

s_0 , g/L	e_0 , UA/L	a , min^{-1}	b	a_m , min^{-1}
38.45	1.59	0.0058	27.71	0.0055
38.45	3.18	0.0123	24.36	0.0138
38.45	6.36	0.0278	24.48	0.0325
81.16	3.18	0.0057	29.90	0.0050
18.73	3.18	0.0286	24.57	0.0331

Los valores del parámetro a_m indicados en la tabla 5.8 aumentan con la concentración inicial de enzima y disminuyen con la concentración inicial de sustrato como ya se había comentado al observar las figuras 5.13 y 5.14. En la figura 5.15 se ha realizado una representación análoga a la del sistema anterior de los valores de a_m frente a e_0/s_0 , se observa en ella que los resultados se ajustan bien a una relación lineal con ordenada en el origen negativa

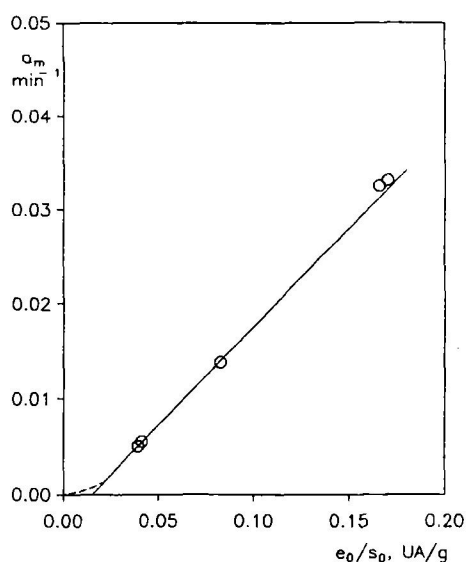


Figura 5.15 Alcalasa 0.6 L

$$a_m = 0.217 \frac{e_0}{s_0} - 0.0036 \quad r^2 = 0.999 \quad [5.21]$$

con lo que la ecuación [5.12] queda en la forma:

$$\frac{dx}{dt} = \left(0.217 \frac{e_0}{s_0} - 0.0036 \right) \exp(-26.3 \cdot x) \quad [5.22]$$

y por tanto la velocidad de hidrólisis

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = (0.217e_0 - 0.0036s_0) \exp(-26.3 \cdot x) \quad [5.23]$$

Tabla 5.9

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

T=50°C pH=8.0 $s_0=38.45$ g/L $e_0=6.36$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.58	0.0422	0.0443
3.67	0.0506	0.0540
5.00	0.0606	0.0633
6.17	0.0673	0.0699
7.80	0.0757	0.0775
9.67	0.0841	0.0847
12.00	0.0908	0.0921
15.05	0.0991	0.1000
18.42	0.1058	0.1072
29.00	0.1243	0.1236
37.75	0.1326	0.1333
49.00	0.1427	0.1430
65.17	0.1544	0.1536
85.33	0.1661	0.1637
107.00	0.1762	0.1722
134.33	0.1862	0.1807
180.00	0.1979	0.1918

Tabla 5.10

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 81.16$ g/L $e_0 = 3.18$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.92	0.0135	0.0124
4.82	0.0198	0.0187
6.22	0.0230	0.0227
7.58	0.0270	0.0263
9.53	0.0309	0.0309
11.67	0.0357	0.0354
14.17	0.0405	0.0400
20.25	0.0500	0.0494
23.92	0.0540	0.0541
27.92	0.0587	0.0587
32.92	0.0635	0.0637
38.83	0.0690	0.0689
46.25	0.0746	0.0745
55.50	0.0793	0.0805
67.17	0.0849	0.0870
84.92	0.0912	0.0951
106.17	0.0976	0.1030
129.83	0.1039	0.1102
159.00	0.1111	0.1175
180.00	0.1150	0.0122

5.1.3 Sistema Lactoalbúmina - P.E.M. 2500 S

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados con este sistema, que se indican en las tablas 4.14 a 4.20 se han representado en las figuras 5.16 y 5.17.

En la figura 5.16 se representa la conversión frente al tiempo de hidrólisis para los experimentos realizados con una concentración de proteína de 38.45 g/L y diferentes concentraciones de enzima. En la figura 5.17 se realiza la misma representación para la concentración de enzima de 8.06 UA/L variando en cada experimento la concentración de proteína.

Cuando se representa la conversión frente al producto $e_0 \cdot t$, figura 5.18, se observa que los experimentos de la misma concentración de sustrato tiende a reunirse en una sola línea independientemente de la concentración inicial de enzima, hecho que también ocurría en los sistemas anteriores y que sólo puede explicarse si no se produce desnaturalización enzimática o si ésta es de 2º orden.

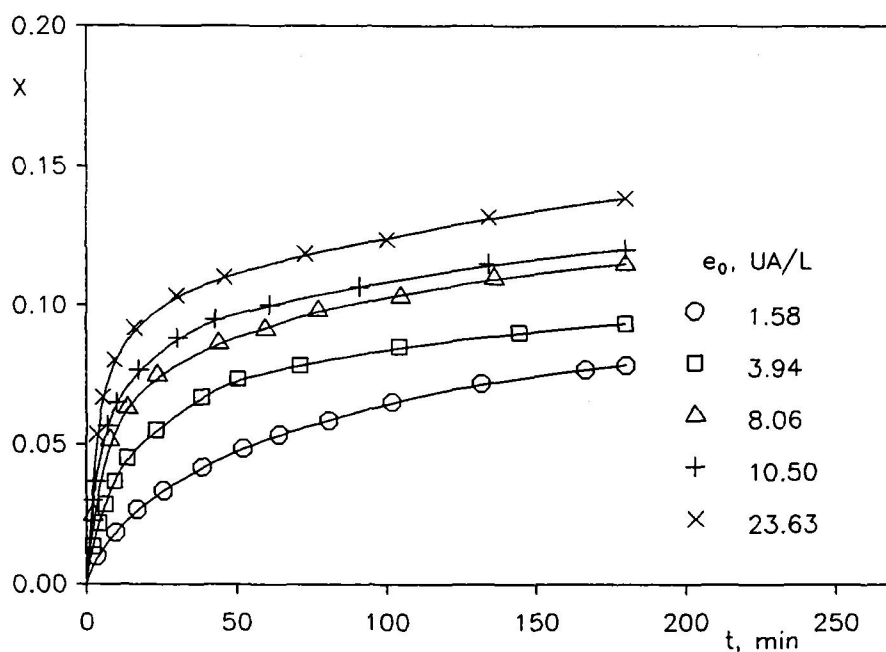


Figura 5.16 P.E.M. 2500 S: $s_0 = 38.45$ g/L

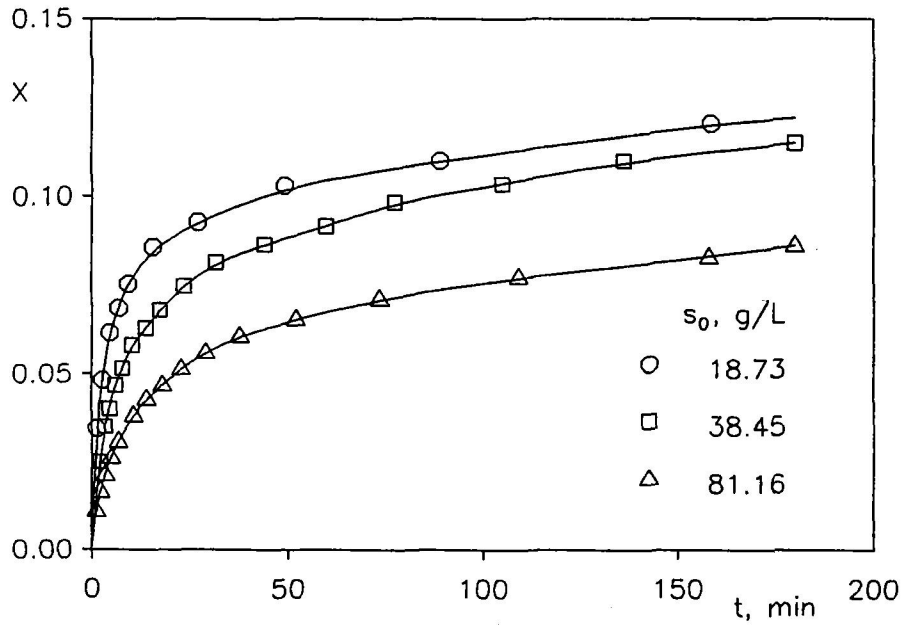


Figura 5.17 P.E.M. 2500 S: $e_0 = 8.06$ UA/L

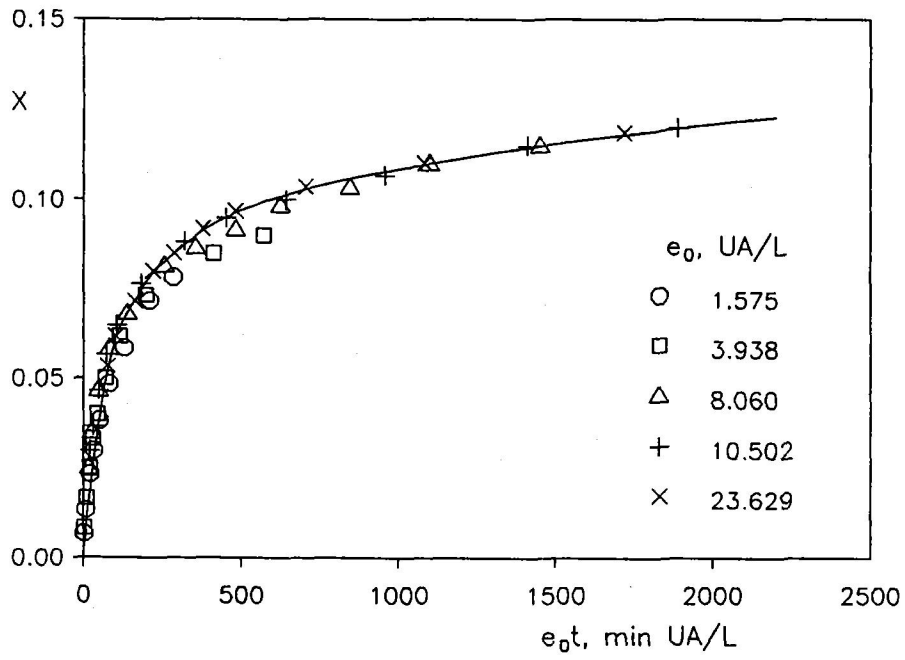


Figura 5.18 P.E.M. 2500 S: $s_0 = 38.45$ g/L

Para la interpretación cinética de los resultados obtenidos en este sistema, se evalúa la velocidad de hidrólisis para diferentes valores de la conversión, es decir, se diferencian los datos primarios obtenidos. Con este fin, como en los sistemas anteriores, se han utilizado funciones spline cúbicas para el ajuste de los resultados experimentales. El programa que realiza estos ajustes y diferencia los datos se indica en el apéndice, apartado 9.1.

Los valores obtenidos mediante este método para dx/dt a diferentes valores de x en los dos experimentos extremos de mayor conversión ($s_0 = 38.45$ g/L; $e_0 = 23.63$ UA/L) y menor conversión ($s_0 = 81.16$ g/L; $e_0 = 8.06$ UA/L) se recogen, a título de ejemplo, en las tablas 5.11 y 5.12. En las tablas 9.9 a 9.13 del apéndice, apartado 9.2, se muestran los resultados obtenidos para los restantes experimentos de este sistema.

Cuando se representa $\log(dx/dt)$ frente a x , figuras 5.19 y 5.20, se observa que los resultados experimentales parecen ajustarse a una relación funcional análoga a la de los sistemas anteriores, ecuación [5.12]. El valor de b es aproximadamente constante mientras que el valor de a , fig 5.19, aumenta con la concentración inicial de enzima, y disminuye considerablemente, fig 5.20, al aumentar la concentración inicial de sustrato.

De forma semejante a los dos sistemas anteriores se han determinado por regresión no lineal los valores de los parámetros cinéticos en la ecuación integrada [5.14]. Los valores obtenidos de estos parámetros en función de las concentraciones iniciales de enzima y sustrato se indican en la tabla 5.13.

Puede observarse que el valor de b parece oscilar alrededor de un valor medio

$$b_m = 48.9 \quad [5.24]$$

aunque la dispersión en este caso es mayor que en los sistemas anteriores. Con este valor medio se han recalculado los correspondientes al parámetro a , promediando los obtenidos para cada punto experimental, que se indican en la última columna de la tabla 5.13. Estos valores medios permiten reproducir de forma aceptable los datos obtenidos, aunque la dispersión entre los valores calculados y experimentales es superior a la encontrada en los sistemas anteriores, como puede observarse en las tablas 5.14 y 5.15 para los experimentos de mayor y menor conversión respectivamente. Los valores recalculados para los otros experimentos de este sistema se indican en las tablas 9.22 a 9.26 del apéndice, apartado 9.4.

En la figura 5.21 se representan los valores de a_m frente a e_0/s_0 , observándose que se ajustan bien a una ecuación lineal con ordenada en el origen negativa

Tabla 5.11

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 23.63$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
3.36	0.055	0.007644
4.09	0.060	0.006205
5.00	0.065	0.004827
6.18	0.070	0.003765
7.64	0.075	0.003116
9.44	0.080	0.002470
11.76	0.085	0.001887
14.76	0.090	0.001491
18.60	0.095	0.001123
24.04	0.100	0.000745
32.65	0.105	0.000484
44.40	0.110	0.000372
60.24	0.115	0.000268
81.76	0.120	0.000213
104.36	0.125	0.000230
126.25	0.130	0.000222
151.10	0.135	0.000174

Tabla 5.12

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $\text{pH} = 8.0$ $s_0 = 81.16 \text{ g/L}$ $e_0 = 8.06 \text{ UA/L}$

t, min	x	dx/dt, 1/min
1.88	0.015	0.005166
2.98	0.020	0.003984
4.42	0.025	0.003074
6.29	0.030	0.002310
8.84	0.035	0.001703
12.07	0.040	0.001423
15.94	0.045	0.001166
20.77	0.050	0.000920
27.10	0.055	0.000672
36.19	0.060	0.000456
48.89	0.065	0.000343
66.31	0.070	0.000238
92.36	0.075	0.000160
129.31	0.080	0.000120
169.95	0.085	0.000137

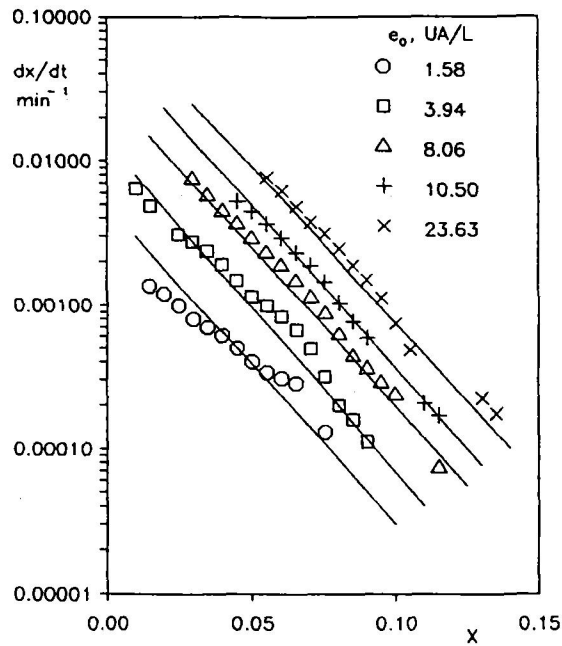


Figura 5.19 P.E.M. 2500 S: $s_0 = 38.45$ g/L

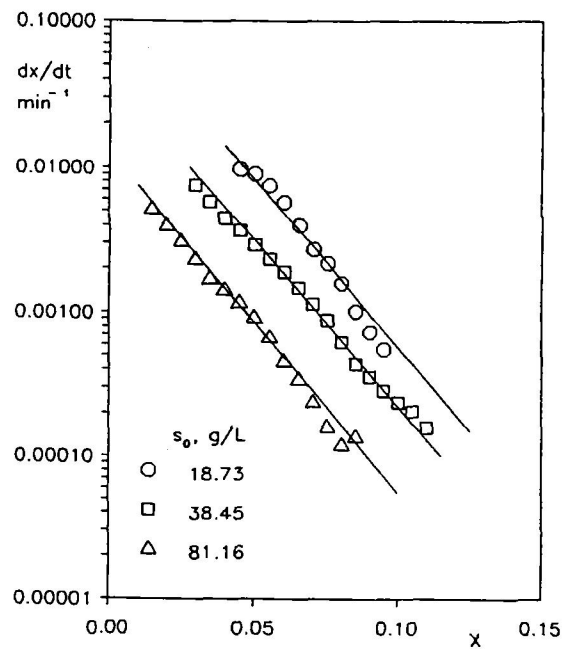


Figura 5.20 P.E.M. 2500 S: $e_0 = 8.06$ UA/L

$$a_m = 0.171 \frac{e_0}{s_0} - 0.0049 \quad r^2 = 0.998 \quad [5.25]$$

por tanto

$$\frac{dx}{dt} = \left(0.171 \frac{e_0}{s_0} - 0.0049 \right) \exp(-48.9 \cdot x) \quad [5.26]$$

y la velocidad de hidrólisis vendrá dada

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = (0.171 e_0 - 0.0049 s_0) \exp(-48.9 \cdot x) \quad [5.27]$$

Tabla 5.13

Lactoalbúmina - P.E.M. 2500 S

Valores de los parámetros cinéticos de la ecuación [5.14]

s_0 , g/L	e_0 , UA/L	a , min ⁻¹	b	a_m , min ⁻¹
38.45	1.58	0.0028	38.42	0.0040
38.45	3.94	0.0107	46.38	0.0115
38.45	8.06	0.0285	47.39	0.0308
38.45	10.50	0.0393	47.19	0.0431
38.45	23.63	0.0994	48.96	0.0992
18.73	8.06	0.1229	57.62	0.0703
81.16	8.06	0.0129	56.08	0.0100

Dado que el ajuste de los datos experimentales mediante la relación funcional [5.12] ha dado peores resultados para este sistema que para los anteriores, se ensayaron también otras relaciones funcionales entre dx/dt y x , obteniéndose un mejor ajuste con la ecuación

Tabla 5.14

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 23.63$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
3.17	0.0534	0.0572
4.33	0.0618	0.0632
5.42	0.0668	0.0676
6.83	0.0718	0.0722
9.25	0.0802	0.0782
12.08	0.0852	0.0836
15.92	0.0918	0.0892
20.33	0.0969	0.0941
29.75	0.1035	0.1018
45.75	0.1102	0.1106
72.75	0.1186	0.1200
100.17	0.1236	0.1266
134.33	0.1319	0.1325
180.00	0.1386	0.1385

Tabla 5.15

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 81.16$ g/L $e_0 = 8.06$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	X_{exp}	X_{cal}
1.20	0.0111	0.0095
2.17	0.0167	0.0148
3.42	0.0214	0.0201
4.83	0.0262	0.0248
6.67	0.0309	0.0297
10.67	0.0381	0.0374
14.00	0.0428	0.0422
18.00	0.0468	0.0467
22.67	0.0516	0.0510
29.00	0.0563	0.0557
37.67	0.0611	0.0607
52.00	0.0658	0.0670
73.50	0.0714	0.0739
109.33	0.0777	0.0818
158.00	0.0833	0.0892
180.00	0.0865	0.0929

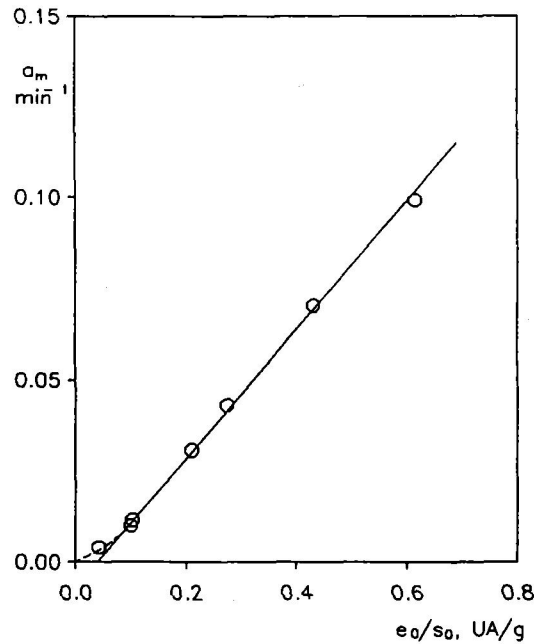


Figura 5.21 P.E.M. 2500 S

$$\frac{dx}{dt} = a_1 x \exp(-b_1 \cdot x) \quad [5.28]$$

como se observa en las figuras 5.22 y 5.23. Esta ecuación sugiere una autocatálisis inicial en la hidrólisis y evidentemente no es aplicable al momento inicial sino que deber ser simplificación de una ecuación de la forma

$$\frac{dx}{dt} = a_1 (c + x) \exp(-b_1 \cdot x) \quad [5.29]$$

si el valor de la constante c es muy pequeño y se hace despreciable frente a x transcurridos los primeros momentos de la hidrólisis. Separando variables en la ecuación [5.28] e integrando entre un valor inicial (t_0, x_0) y un instante cualquiera (t, x) queda

$$\int_{x_0}^x \frac{\exp(b_1 \cdot x)}{x} dx = a_1 (t - t_0) \quad [5.30]$$

La integral del primer miembro de [5.30] puede realizarse mediante un desarrollo en serie

$$\int_{x_0}^x \frac{\exp(b_1 \cdot x)}{x} dx = \log x + \frac{b_1 \cdot x}{1} + \frac{b_1^2 \cdot x^2}{2 \cdot 2!} + \frac{b_1^3 \cdot x^3}{3 \cdot 3!} + \dots \quad [5.31]$$

lo que permite preparar un programa de regresión no lineal para determinar los mejores valores de los parámetros cinéticos a_1 y b_1 , eliminando así los errores inherentes al cálculo de las derivadas en el método diferencial. El programa utilizado con esta finalidad se indica en el apéndice, apartado 9.3.

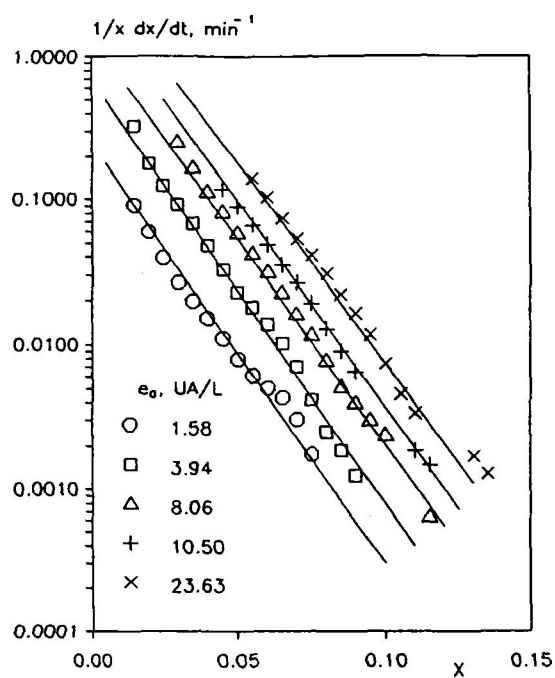


Figura 5.22 P.E.M. 2500 S: $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$

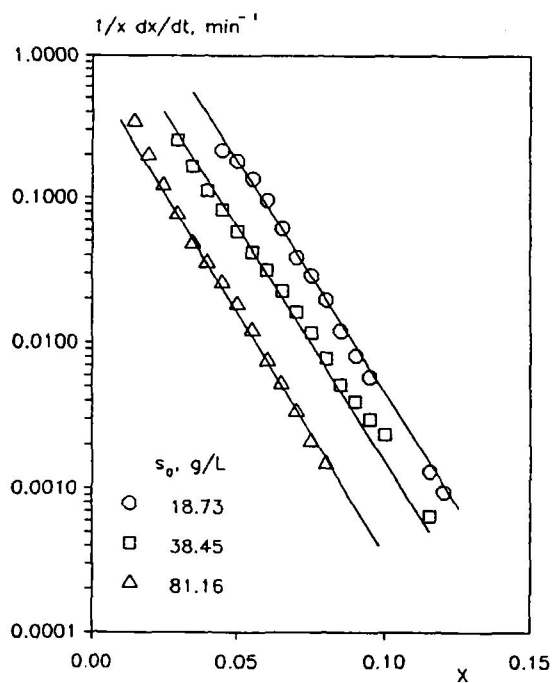


Figura 5.23 P.E.M. 2500 S: $e_0 = 8.06 \text{ UA/L}$

Los valores obtenidos así de los parámetros cinéticos en función de las concentraciones iniciales de sustrato y enzima se indican en la tabla 5.16.

Tabla 5.16
Lactoalbúmina - P.E.M. 2500 S
Valores de los parámetros cinéticos de la ecuación [5.30]

s_0 , g/L	e_0 , UA/L	a_1 , min ⁻¹	b_1	a_{1m} , min ⁻¹
38.45	1.58	0.1993	61.62	0.2757
38.45	3.94	1.1069	75.17	0.8058
38.45	8.06	1.2160	62.35	1.8796
38.45	10.50	2.5169	66.97	2.5752
38.45	23.63	2.2638	57.32	6.7947
18.73	8.06	6.9034	75.41	4.0725
81.16	8.06	0.8244	77.77	0.6325

Se observa en esta tabla que los valores de b_1 oscilan alrededor de un valor medio que resulta ser 68.1; con este valor se han recalculado los correspondientes al parámetro cinético a_{1m} promediando los obtenidos para cada punto experimental, que se indican también en la última columna de la tabla 5.16. Estos valores medios permiten reproducir de forma aceptable los resultados experimentales como se observa a título de ejemplo en las tablas 5.17 y 5.18. Los valores recalculados para los restantes experimentos de este sistema se encuentran en las tablas 9.27 a 9.31 del apéndice, apartado 9.4.

Los resultados obtenidos sugieren que el valor del parámetro cinético a_{1m} parece ser directamente proporcional a la concentración inicial de enzima e inversamente proporcional a la concentración inicial de sustrato, por lo que se ha ensayado también la ecuación [5.17], figura 5.24.

Como puede observarse, los resultados se ajustan aceptablemente

$$a_{1m} = 11.24 \frac{e_0}{s_0} - 0.408 \quad r^2 = 0.991 \quad [5.32]$$

Tabla 5.17

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T=50°C pH=8.0 $s_0=38.45$ g/L $e_0=23.63$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.30]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
3.17	0.0534	0.0534
4.33	0.0618	0.0614
5.42	0.0668	0.0656
6.83	0.0718	0.0701
9.25	0.0802	0.0803
12.08	0.0852	0.0846
15.92	0.0918	0.0923
20.33	0.0969	0.0977
29.75	0.1035	0.1038
45.75	0.1102	0.1093
72.75	0.1186	0.1179
100.17	0.1236	0.1223
134.33	0.1319	0.1338
180.00	0.1386	0.1419

Tabla 5.18

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 81.16$ g/L $e_0 = 8.06$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.30]

t, min	X_{exp}	X_{cal}
1.20	0.0111	0.0111
2.17	0.0167	0.0190
3.42	0.0214	0.0241
4.83	0.0262	0.0292
6.67	0.0309	0.0334
10.67	0.0381	0.0390
14.00	0.0428	0.0429
18.00	0.0468	0.0457
22.67	0.0516	0.0504
29.00	0.0563	0.0547
37.67	0.0611	0.0589
52.00	0.0658	0.0615
73.50	0.0714	0.0655
109.33	0.0777	0.0700
158.00	0.0833	0.0736
180.00	0.0865	0.0780

Con esto la ecuación [5.28] queda en la forma

$$\frac{dx}{dt} = \left(11.24 \frac{e_0}{s_0} - 0.408 \right) x \exp(-68.1 \cdot x) \quad [5.33]$$

y la velocidad de hidrólisis

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = (11.24 e_0 - 0.408 s_0) x \exp(-68.1 \cdot x) \quad [5.34]$$

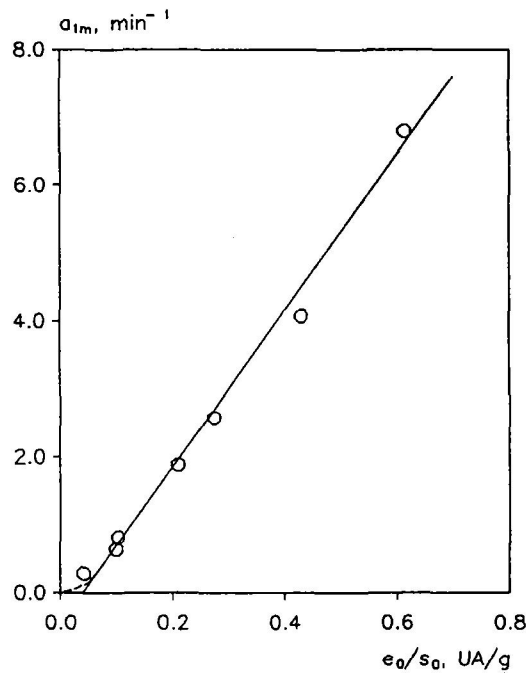


Figura 5.24 P.E.M. 2500 S

5.1.4 Comparación de los tres sistemas estudiados

La expresión más general para la velocidad de hidrólisis deducida del estudio cinético de los tres sistemas considerados es

$$r_h = (c_1 \cdot e_0 - c_2 \cdot s_0) \exp(-c_3 \cdot x) \quad [5.35]$$

ecuaciones [5.19], [5.23] y [5.27] respectivamente. La forma de esta ecuación indica que por debajo de una concentración inicial crítica de enzima

$$e_{oc} = \frac{c_2 \cdot s_0}{c_1} \quad [5.36]$$

no se produce hidrólisis, puesto que no tendría sentido considerar que la velocidad de hidrólisis es negativa. Este hecho sólo puede explicarse admitiendo la existencia en el sustrato de un inhibidor de la proteasa, que se confirma también porque el término negativo es proporcional a la concentración inicial de sustrato.

En efecto, recientemente Weber y Nielsen (1991) demuestran la existencia en el suero láctico de la leche de vaca de un inhibidor de serina-proteinasas que caracterizan e identifican como semejante al inhibidor Ó₁-AT presente en la sangre humana y bovina. De acuerdo con Beatty *et al.* (1980) estos inhibidores actúan de forma irreversible y muy rápida de manera que en tiempos muy cortos se combinan irreversiblemente con la enzima que deja de estar disponible para la hidrólisis.

Puesto que la concentración de inhibidor será proporcional a la concentración inicial de sustrato utilizada y admitiendo que la unión irreversible al inhibidor es un proceso mucho más rápido que la hidrólisis, la concentración de enzima activa que actuará en cada experimento será:

$$e_{oa} = e_0 - c_4 \cdot s_0 \quad [5.37]$$

de manera que la ecuación [5.35] quedaría en la forma

$$r_h = c_1 \cdot e_{oa} \exp(-c_3 \cdot x) \quad [5.38]$$

ecuación semejante a la obtenida en nuestros laboratorios para la hidrólisis de caseína con las mismas enzimas, pero con e_0 en vez de e_{a0} ya que en la caseína parece no estar presente el inhibidor.

En la figura 5.25 se representan conjuntamente los valores de a_m frente a e_0/s_0 para los sistemas Lactoalbúmina - Protease 660 L y Lactoalbúmina - Alcalasa 0.6 L, en ella se observa que ambos sistemas se ajustan bien a una ecuación única, por regresión lineal se obtiene

$$a_m = 0.226 \frac{e_0}{s_0} - 0.0049 \quad r^2 = 0.988 \quad [5.39]$$

La coincidencia de los resultados de ambos sistemas no es de extrañar ya que los dos complejos enzimáticos se obtienen por fermentación de bacterias del género *Bacillus* y es conocido que su componente principal es la serina-proteasa subtilisina activa sobre un gran número de enlaces peptídicos.

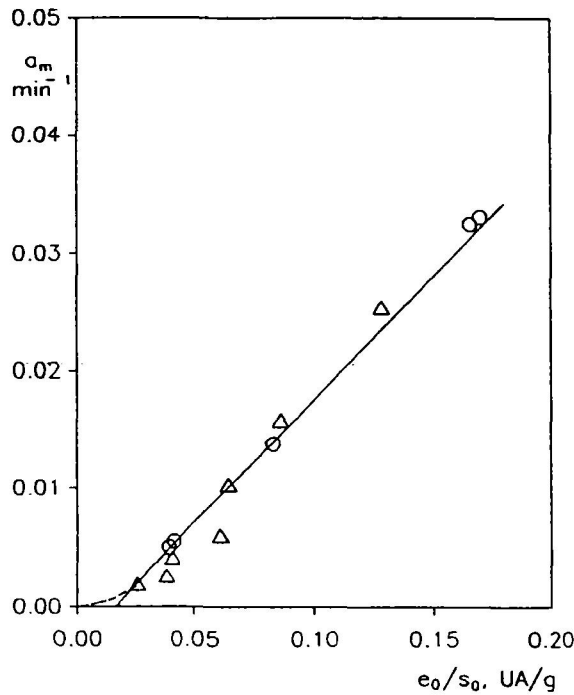


Figura 5.25 Proteasas bacterianas

concentración de éste.

De acuerdo con la ecuación [5.36] la concentración inicial crítica de las enzimas bacterianas es

$$e_{oc} = 0.022 s_0 \quad \text{UA/L} \quad [5.40]$$

y debe tenerse presente que aunque en la figura 5.25 los valores de a_m se hacen negativos para valores de e_0/s_0 inferiores a 0.022 UA/g, en el proceso real la unión irreversible del inhibidor a la enzima activa requerirá un cierto tiempo aunque pequeño y la variación de a_m con la relación e_0/s_0 tendrá lugar en la forma indicada por la línea de puntos en la figura anterior.

También conviene señalar que las dos ecuaciones funcionales aplicadas para el sistema Lactoalbúmina - P.E.M. 2500 S, ecuaciones [5.27] y [5.34], ponen de manifiesto la presencia del inhibidor en el sustrato y conducen a valores semejantes de la concentración inicial crítica de enzima

$$e_{oc} = 0.029 s_0 \quad \text{UA/L} \quad \text{ec.}[5.27] \quad [5.41]$$

$$e_{oc} = 0.036 s_0 \quad \text{UA/L} \quad \text{ec.}[5.42] \quad [5.42]$$

No ocurre lo mismo con el complejo enzimático de origen animal P.E.M. 2500 S, que está formado fundamentalmente por tripsina y quimotripsina, pero resulta interesante comparar la ecuación [5.25] obtenida con este último complejo enzimático con la ecuación [5.39] correspondiente a los dos complejos enzimáticos bacterianos: se observa que la pendiente de esta última es superior indicando que la subtilisina es más activa para la hidrólisis que las proteasas de origen animal, pero la ordenada en el origen negativa coincide en ambas ecuaciones indicando que es una característica del sustrato más que del complejo enzimático utilizado, lo que de nuevo está de acuerdo en que debe representar la existencia de un inhibidor irreversible en el sustrato y su valor numérico debe estar relacionado con la

5.2 DISTRIBUCION DE TAMAÑOS MOLECULARES

Para el estudio de la distribución de tamaños moleculares a medida que progresa la hidrólisis se analizará en primer lugar el sistema lactoalbúmina - alcalasa 0.6 L, ya que de las dos enzimas bacterianas utilizadas es con esta con la que se ha realizado un análisis experimental más extenso de la distribución de pesos moleculares.

5.2.1 Sistema Lactoalbúmina - Alcalasa 0.6 L

A partir de los resultados obtenidos en las muestras analizadas por cromatografía líquida de alta presión para los experimentos realizados con este sistema a tres niveles de concentraciones iniciales de sustrato y tres niveles de concentraciones iniciales de enzima, tablas 4.23 a 4.27, se observa que la distribución de tamaños moleculares del hidrolizado parece depender exclusivamente del grado de hidrólisis alcanzado y no de los valores concretos para cada experimento de las concentraciones iniciales de sustrato y enzima.

Con objeto de comprobar esta hipótesis se ha determinado por interpolación en las tablas 4.23 a 4.27 la distribución de tamaños moleculares para un grado de hidrólisis del 10 % en este sistema que se indica en la tabla 5.19. En esta tabla se observa que los % en áreas de las fracciones de tamaño molecular analizadas oscilan alrededor de un valor medio sin mostrar tendencia alguna al variar las concentraciones iniciales de sustrato y de enzima.

Tabla 5.19

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

Distribución de tamaños moleculares para un grado de hidrólisis del 10%

% en áreas de los cromatogramas

e_0 , AU/L	s_0 , g/L	40-70 kDa	20-40 kDa	3-20 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
1.59	38.45	2.7	1.1	10.1	27.5	58.7
3.18	38.45	1.6	2.2	10.9	30.0	54.0
6.36	38.45	1.9	---	11.0	28.9	58.2
3.18	81.16	2.4	1.2	9.6	29.1	57.7
3.18	18.73	2.0	---	9.2	30.6	58.2

Por esta razón, en las figuras 5.26 a 5.30 se representan los % en áreas correspondientes a las distintas fracciones de tamaños moleculares en función del grado de hidrólisis, resultados que se encuentran en las tablas 4.23 a 4.27. Se observa en ellas, de nuevo, que aunque con dispersión apreciable aparecen mezclados los puntos correspondientes a los distintos experimentos realizados con este sistema, lo que confirma que la distribución de tamaños en función exclusivamente del grado de hidrólisis alcanzado, para un sistema dado y a temperatura y pH constantes.

En la figura 5.26 se representa la fracción de mayor peso molecular, > 40 kDa, que está constituida fundamentalmente por seroalbúmina y los resultados obtenidos indican que a partir del 15 % de grado de hidrólisis la proporción de seroalbúmina permanece constante en un valor próximo al 1 % en área, por lo menos hasta grados de hidrólisis del 21 % que es el valor máximo alcanzado con este sistema. Este resultado sugiere que la cantidad indicada de la seroalbúmina existente en el sustrato original es resistente a la hidrólisis con Alcalasa 0.6 L en las condiciones consideradas.

La evolución con el grado de hidrólisis de la fracción de tamaño molecular comprendido entre 20 y 40 kDa, que comprende fundamentalmente β -lactoglobulina y fragmentos de seroalbúmina, peso molecular medio de 22 a 25 kDa, desaparece por completo al alcanzarse un grado de hidrólisis del 10 %, figura 5.27.

La fracción de 3 a 20 kDa, formada por α -lactoalbúmina o fragmentos de los polímeros superiores, peso molecular medio de 12 a 15 kDa, desaparece por completo al alcanzarse un grado de hidrólisis del 14 %, figura 5.28.

Es interesante comparar las figuras 5.26, 5.27 y 5.28, que representan la desaparición de los tamaños moleculares del orden de magnitud de los componentes originales del sustrato: seroalbúmina, β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina; en el sentido de que las dos primeras son convexas hacia el origen indicando que la velocidad de desaparición disminuye al aumentar el grado de hidrólisis como es lógico esperar por la desaparición de los polí-

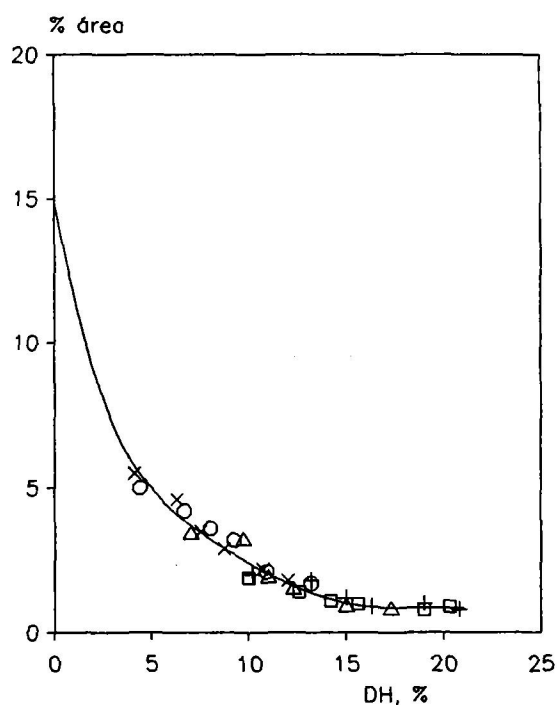


Figura 5.26 $40 \text{ kDa} < PM < 70 \text{ kDa}$

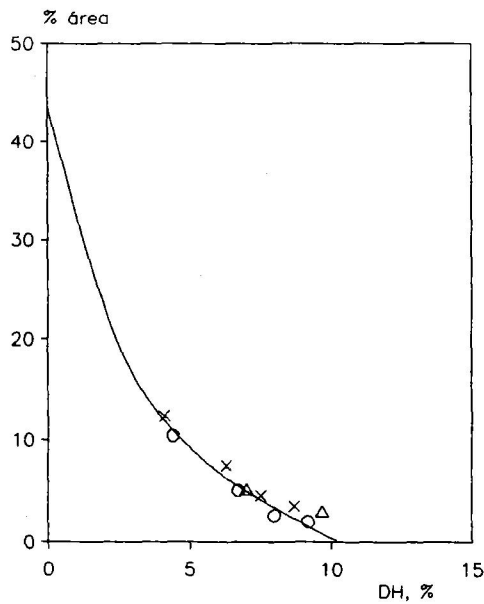


Figura 5.27 20 kDa < PM < 40 Kda

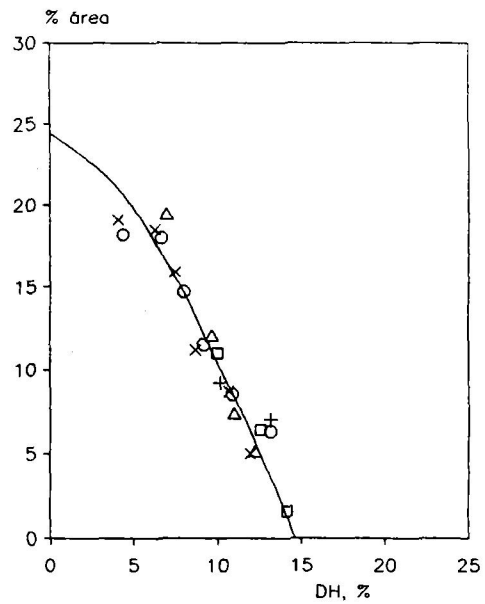


Figura 5.28 3 kDa < PM < 20 kDa

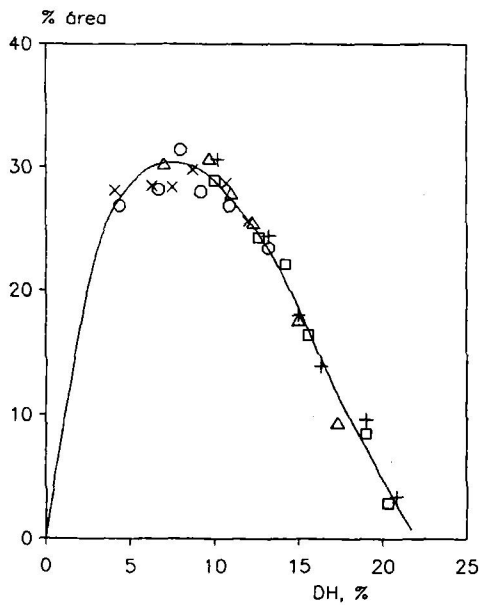


Figura 5.29 1 kDa < PM < 3 kDa

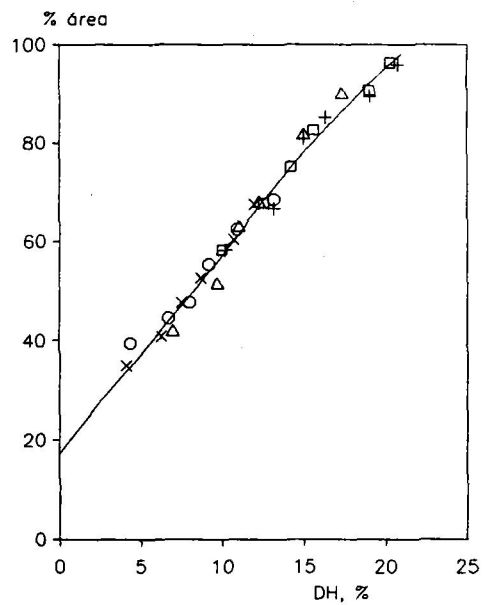


Figura 5.30 PM < 1 kDa

Alcalasa 0.6 L: (o) 38.45 g/L - 1.59 UA/L; (Δ) 38.45 g/L - 3.18 UA/L; (\square) 38.45 g/L - 6.36 UA/L;
 (x) 81.16 g/L - 3.18 UA/L; (+) 18.73 g/L - 3.18 UA/L

meros de los tamaños moleculares considerados. Sin embargo, en la figura 5.30 ocurre lo contrario, la forma de la curva es cóncava hacia el origen, lo que indica que la velocidad de desaparición aumenta al aumentar el grado de hidrólisis, que indudablemente es debido a que la velocidad neta de desaparición de esta fracción es el resultado de su desaparición menos su formación por hidrólisis de los polímeros superiores, de hecho la concavidad señalada desaparece para grados de hidrólisis superiores al 10 %, en que los polímeros superiores han terminado prácticamente de descomponerse. En resumen, de estas tres figuras se deduce también que para grados de hidrólisis superiores al 15 %, el hidrolizado está formado salvo un 1 % de seroalbúmina por péptidos de tamaño inferior a 3000 Da.

En la figura 5.29 se representa la fracción de péptidos comprendidos entre 1000 y 3000 Da frente al grado de hidrólisis. Se observa en esta figura que la fracción considerada pasa por un máximo entre el 8 % y el 10 % de hidrólisis, en el que constituye alrededor del 30 % del hidrolizado para disminuir de manera continua para grados de hidrólisis superiores, quedando entre un 3 y un 4 % para grados de hidrólisis del orden del 20 %.

Finalmente, la fracción de peso molecular inferior a 1000 Da, constituida fundamentalmente por di- y tripéptidos aunque el método no permite precisar la fracción de aminoácidos libres, se representa en la figura 5.30 frente al grado de hidrólisis, en la que se observa que crece continuamente hasta constituir más del 95 % del hidrolizado al alcanzarse grados de hidrólisis del 20 %.

En resumen, cuando con el sistema considerado se alcanzan grados de hidrólisis superiores al 20 %, el hidrolizado está formado aproximadamente por un 96 % de péptidos de tamaño inferior a 1000 Da, un 3 % de péptidos de tamaño comprendido entre 1000 y 3000 Da y un 1 % de seroalbúmina resistente a la hidrólisis, peso molecular aproximado 60 kDa.

5.2.2 Sistema Lactoalbúmina - Protease 660 L

De manera semejante al sistema anterior, pero sólo para dos experimentos con $s_0 = 38.45$ g/L y dos concentraciones iniciales de enzima 3.30 y 6.60 UA/L, se analizó la distribución de tamaños moleculares en este sistema a medida que evoluciona la hidrólisis, tablas 4.21 y 4.22.

En estas tablas y en las figuras 5.31 a 5.34 se observa que aunque con mayor dispersión que en el sistema anterior los resultados experimentales de los dos experimentos considerados se mezclan por completo cuando se representan los porcentajes en áreas cromatográficas frente al grado de hidrólisis, lo que confirma para este sistema que la distribución de tamaños moleculares es función exclusiva del grado de hidrólisis.

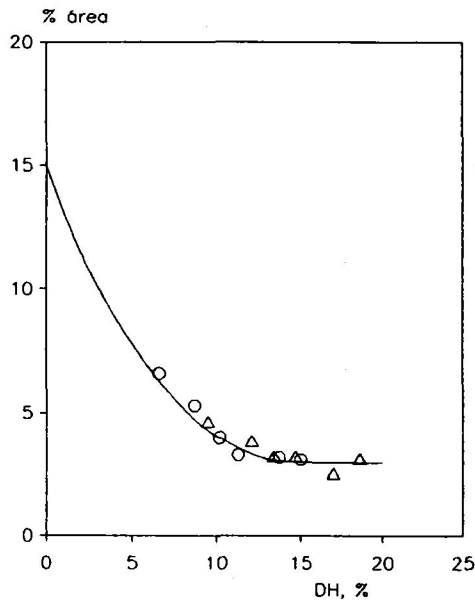


Figura 5.31 40 kDa < PM < 70 kDa

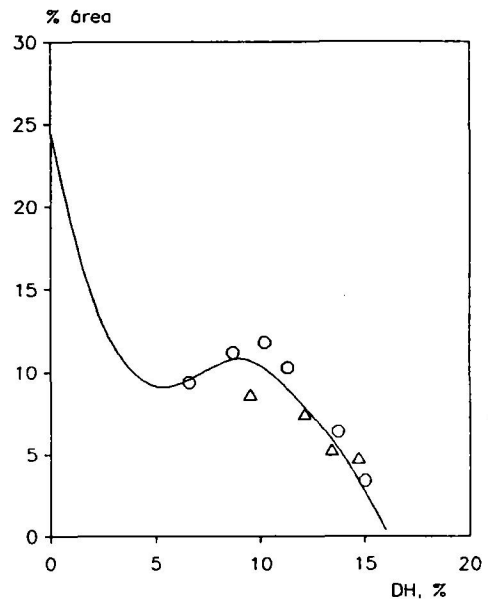


Figura 5.32 10 < PM < 20 kDa

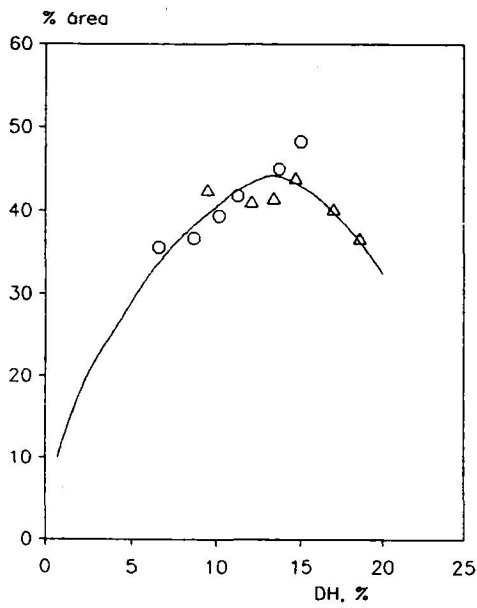


Figura 5.33 1 kDa < PM < 3 kDa

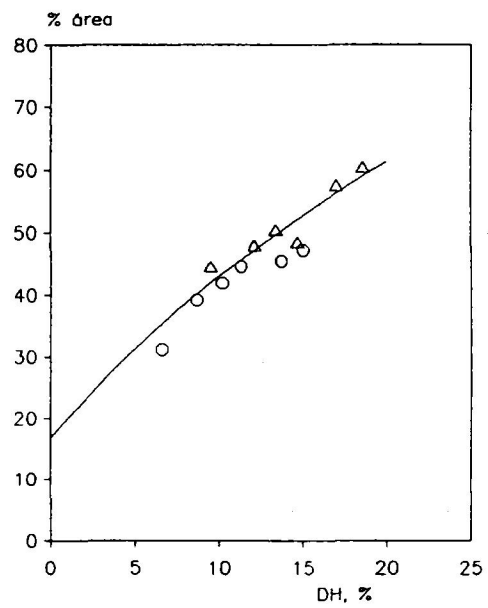


Figura 5.34 PM < 1 kDa

Protease 660 L: (o) 38.45 g/L - 3.30 UA/L; (Δ) 38.45 g/l - 6.60 UA/L

La fracción de mayor tamaño molecular, correspondiente a la seroalbúmina tiene un comportamiento semejante al del sistema anterior, si bien su valor residual, constante a partir del 15 % de hidrólisis es del orden del 3 %, figura 5.31.

La fracción de 20 a 40 kDa desaparece por completo para grados de hidrólisis del 9 - 10 %.

La fracción de 10 a 20 kDa, figura 5.32, debe disminuir rápidamente desde su contenido inicial en el sustrato, α -lactoalbúmina, para aumentar después presentando un máximo suave hacia el 10 % de hidrólisis, debido a los fragmentos de este tamaño procedentes de la hidrólisis de los polímeros superiores que acaba prácticamente en este grado de hidrólisis, para volver a disminuir y desaparecer prácticamente para grados de hidrólisis superiores al 20 %.

Curiosamente los péptidos entre 3 y 10 kDa que no existen en el sustrato original se forman sólo en los primeros momentos de la hidrólisis y desaparecen por completo para grados de hidrólisis del 9 - 10 %.

Los péptidos de 1000 a 3000 Da, figura 5.33, parecen pasar por un máximo del orden del 45 % del hidrolizado a grados de hidrólisis del 13 - 15 % y a continuación disminuye ligeramente, quedando finalmente para un grado de hidrólisis del 19 %, máximo alcanzado, alrededor de un 35 % del hidrolizado.

Finalmente los péptidos de menos de 1000 Da, que como en el sistema anterior parecen estar formados fundamentalmente por di- y tri-péptidos crecen de forma continua para alcanzar un 61 % del hidrolizado a un grado de hidrólisis del 19 %.

En resumen, la distribución de tamaños moleculares para este sistema indica que por encima del 16 % de hidrólisis, el hidrolizado está formado por un 3 % de seroalbúmina resistente a la hidrólisis, al menos en el intervalo investigado, y un 97 % de péptidos de tamaño inferior a 3000 Da, que cuando se alcanza el 19 % de hidrólisis están distribuidos en un 35 % entre 1000 y 3000 Da y un 61 % menor de 1000 Da.

5.2.3 Sistema Lactoalbúmina - P.E.M. 2500 S

Los resultados obtenidos con este sistema se indican en las tablas 4.28 a 4.32 y se han representado en las figuras 5.35 a 5.40.

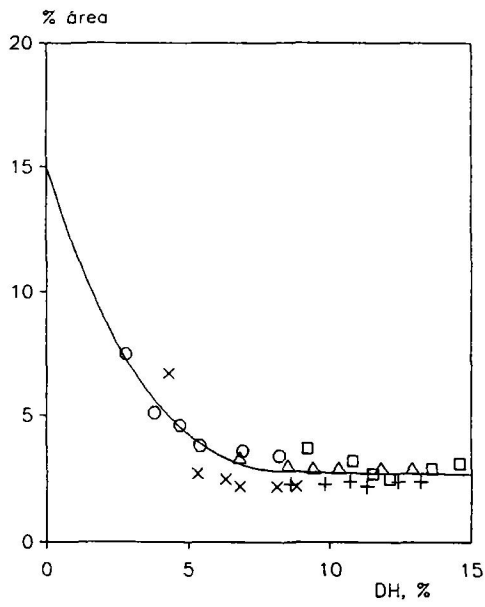


Figura 5.35 40 kDa < PM < 70 kDa

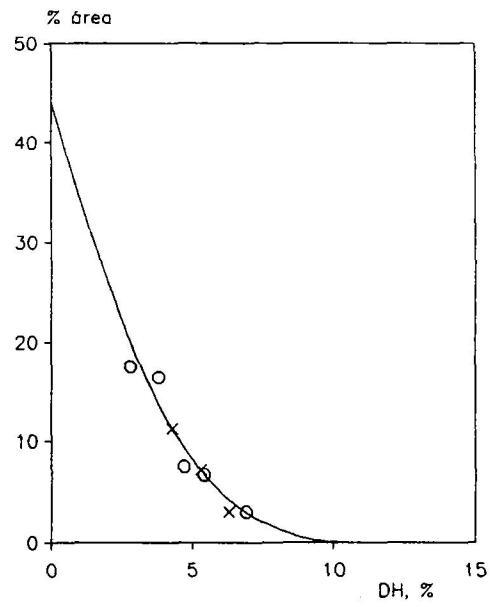


Figura 5.36 20 kDa < PM < 40 kDa

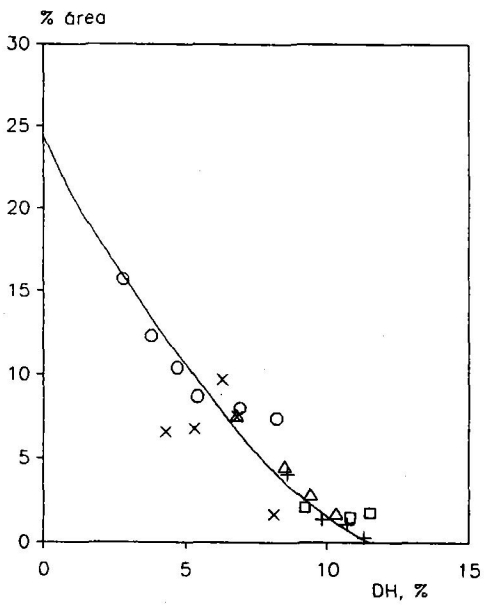


Figura 5.37 10 kDa < PM < 20 kDa

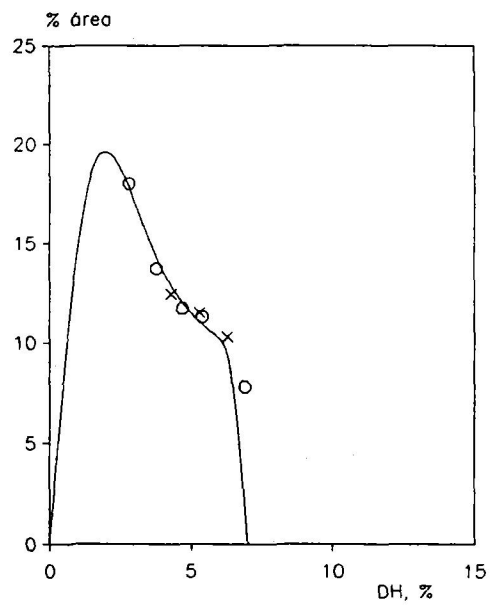


Figura 5.38 3 kDa < PM < 10 kDa

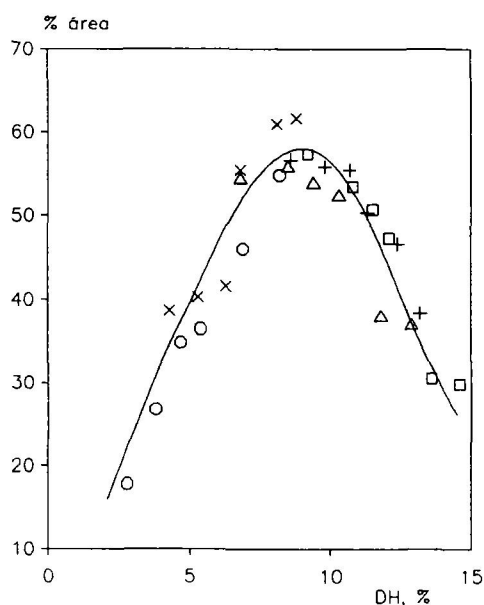


Figura 5.39 1 kDa < PM < 3 kDa

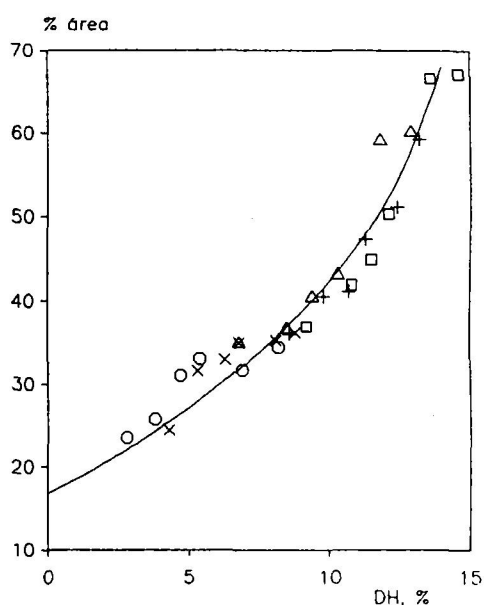


Figura 5.40 PM < 1 kDa

P.E.M. 2500 S: (o) 38.45 g/L - 1.58 UA/L; (Δ) 38.45 g/L - 8.06 UA/L; (\square) 38.45 g/l - 23.63 UA/L;
(x) 81.16 g/l - 8.06 UA/L; (+) 18.73 g/L - 8.06 UA/L

El comportamiento de la seroalbúmina coincide con el de los sistemas anteriores, con un valor residual del 2.5 % que se alcanza prácticamente al 8 % de hidrólisis, figura 5.35. La fracción de 20 a 40 kDa desaparece prácticamente al 8 % de hidrólisis, figura 5.36. La fracción de 10 a 20 kDa se comporta de forma semejante a la anterior y desaparece prácticamente al 11 % de hidrólisis, figura 5.37.

Los péptidos de 3 a 10 kDa deben pasar por un máximo a grados de hidrólisis del orden del 2 % para disminuir bruscamente a partir de este valor y desaparecer por completo a grados de hidrólisis del 6 - 7 %, figura 5.38.

Los péptidos de 1000 a 3000 Da pasan por un máximo alrededor del 8 - 10 % de hidrólisis en el que constituyen cerca del 60 % del hidrolizado, para disminuir a continuación hasta un valor del orden del 30 % del hidrolizado a un grado de hidrólisis del 15 %, máximo alcanzado, figura 5.39.

Finalmente los péptidos de tamaño inferior a 1000 Da crecen continuamente, con pendiente creciente hasta alcanzar el 67 % del hidrolizado a un grado de hidrólisis del 14 %, figura 5.40.

El hidrolizado final para un grado de hidrólisis del 14 % está formado por un 2 - 3 % de seroalbúmina residual, un 30 % de péptidos de 1000 a 3000 Da y un 67 % de péptidos de tamaño inferior a 1000 Da.

5.2.4 Comparación entre los tres sistemas estudiados

La desaparición de seroalbúmina, figuras 5.26, 5.31 y 5.35, es semejante en los tres sistemas, disminuyendo rápidamente hasta alcanzar un valor residual que permanece constante. Sin embargo, en los sistemas bacterianos el valor residual se alcanza para grados de hidrólisis del orden del 15 %, mientras que con las proteasas pancreáticas se alcanza a un grado de hidrólisis próximo al 8 %. En cuanto al valor residual el mínimo corresponde a la Alcalasa 0.6 L que es del orden de 1 % y en los otros dos sistemas del 2.5 a 3 %.

La fracción de 20 - 40 kDa, β -globulina y fragmentos de seroalbúmina, presenta el mismo comportamiento en los tres sistemas desapareciendo completamente a grados de hidrólisis del orden del 9 - 10 %, figuras 5.27 y 5.36.

La fracción de 3 - 20 kDa, α -lactoalbúmina y fragmentos de polímeros superiores, que en los sistemas con Protease 660 L y P.E.M. 2500 S se ha separado en las fracciones de 3 - 10 y de 10 - 20 kDa, presenta un comportamiento en las enzimas bacterianas algo distinto que en el sistema de origen animal, ya que en los primeros parece insinuarse la presencia de un máximo a bajos valores de grado de hidrólisis para disminuir a continuación y desaparecer por completo a grados de hidrólisis del orden de 15 %; mientras que con el P.E.M. 2500 S disminuye continuamente desde el principio y desaparece a grados de hidrólisis del orden del 10 %, figuras 5.28, 5.32 y 5.37.

Los péptidos de 1000 a 3000 kDa presentan en todos los casos el mismo comportamiento con un máximo claro de valor y situación que se indica a continuación, figuras 5.29, 5.33 y 5.39

Enzima	% área	situación, DH
Alcalasa 0.6 L	30	8 - 10
Protease 660 L	45	13 - 15
P.E.M. 2500 S	60	8 - 10

y disminuyendo a continuación aunque queda con un valor importante para el máximo grado de hidrólisis alcanzado, salvo en la alcalasa que representa sólo el 3 % del hidrolizado final, si bien con este sistema se alcanza el mayor grado de hidrólisis del orden del 21 %.

Finalmente los péptidos menores de 1000 Da, crecen continuamente en los tres sistemas a una velocidad relativa al grado de hidrólisis aproximadamente constante para las enzimas bacterianas y creciente para el P.E.M. 2500 S, figuras 5.30, 5.34 y 5.40.

Es interesante destacar que la diferencia más apreciable entre las enzimas bacterianas y las de origen animal estriba en el intervalo de DH de existencia de los péptidos intermedios, de manera que por encima del 10 % de hidrólisis para el P.E.M. 2500 S y por encima del 15 % para las dos enzimas bacterianas los cromatogramas muy semejantes para los tres sistemas indican que el hidrolizado está formado por el valor constante y pequeño 1 - 3 % de la seroalbúmina residual y péptidos de tamaño inferior a 3000 Da. A partir de estos valores del grado de hidrólisis va disminuyendo la fracción de péptidos de 1000 a 3000 Da y aumentando la de péptidos menores de 1000 Da en los tres sistemas considerados.

5.3 MODELO CINETICO PROPUESTO

La ecuación cinética obtenida en el estudio experimental de los tres sistemas considerados es:

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = (\beta \cdot e_0 - \delta \cdot s_0) \exp(-\gamma \cdot x) \quad [5.43]$$

el término negativo del binomio del segundo miembro se ha explicado ya como debido a la presencia de un inhibidor irreversible en el sustrato. Este inhibidor aislado y caracterizado parcialmente por Weber y Nielsen (1991) en el suero láctico, de un peso molecular aproximado de 60000 kDa, es semejante al inhibidor Ó₁-antitripsina de la sangre humana y bovina. La cinética de la acción de estos inhibidores irreversibles sobre las serina-proteinasas es compleja de estudiar dado que su acción es muy rápida, sin embargo Beatty *et al.* (1980) han llegado a determinar la constante cinética de asociación correspondiente al proceso



para el inhibidor designado por estos autores Ó₁-PI de la sangre humana. La reacción [5.44] parece ser de segundo orden y el valor de la constante cinética a 25°C y pH=8.0 es el indicado a continuación para su acción sobre diferentes proteasas

Tabla 5.20
Resultados de Beatty *et al.* (1980)

Enzima	$k_i, M^{-1}s^{-1}$
quimotripsina bovina	$5.9 \cdot 10^6$
tripsina bovina	$1.3 \cdot 10^6$
tripsina porcina	$4.2 \cdot 10^4$

La ecuación de velocidad correspondiente a este proceso será

$$-\frac{de}{dt} = k_i \cdot e \cdot i \quad [5.45]$$

y si el inhibidor está contenido en el sustrato y se combina en la relación molar 1/1 con la enzima activa como es admitido actualmente, su concentración en cualquier instante será

$$i = e \cdot s_0 - (e_0 - e) \quad [5.46]$$

sustituyendo [5.46] en [5.45] e integrando se obtiene

$$e = \frac{e_0 (e_0 - e \cdot s_0)}{e_0 - e \cdot s_0 \exp(- (e_0 - e \cdot s_0) k_i \cdot t)} \quad [5.47]$$

ecuación que como se observa cumple bien las condiciones límites ya que para $t=0$ da $e=e_0$ y para $t = \infty$ conduce a $e = e_0 - e \cdot s_0$.

Con objeto de determinar el orden de magnitud del intervalo de tiempo en el que se produce este proceso se han utilizado las constantes determinadas por Beatty *et al.* para los tres componentes del P.E.M. 2500 S utilizado en esta investigación, suponiendo que unas concentraciones iniciales de enzima e inhibidor de $1 \mu M$ y $0.1 \mu M$ respectivamente y evaluando mediante la ecuación [5.47] el tiempo necesario para que se alcance el 90 % de la transformación total posible

$$0.91 = \frac{1 (1 - 0.1)}{1 - 0.1 \exp(- (1 - 0.1) k_i \cdot t)}$$

los valores de k_i utilizados son los indicados en la tabla 5.20 y los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 5.21

Tabla 5.21
tiempo necesario para alcanzar el 90 % de conversión de la reacción [5.44]

Enzima	t, min
quimotripsina bovina	0.007
tripsina bovina	0.3
tripsina porcina	0.1

Este resultado pone de manifiesto que la unión irreversible del inhibidor a la enzima activa es un proceso mucho más rápido que la hidrólisis y por tanto que el resultado de la presencia del inhibidor es prácticamente equivalente a que en el momento inicial la concentración de enzima activa sea

$$e_{0a} = e_0 - e \cdot s_0 \quad [5.48]$$

donde e es proporcional a la fracción del sustrato constituida por el inhibidor, con lo que substituyendo [5.48] en [5.43]

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = \beta \cdot e_{0a} \exp(-\gamma \cdot x) \quad [5.49]$$

La ecuación [5.49] representa la cinética de la hidrólisis excluido ya el fenómeno rápido de la unión de la enzima activa al inhibidor que ocurre en los primeros instantes.

Como ya se ha indicado en la interpretación de los resultados la disminución continua de la velocidad de hidrólisis que indica la ecuación [5.49] debe estar provocada por inhibición de producto o desnaturalización de la enzima de segundo orden, siendo esta última condición del orden de la desnaturalización provocada por el hecho experimental de que el producto $e_0 \cdot t$ se comporta aceptablemente como variable intensiva del tratamiento enzimático.

Por tanto, el sistema debe venir representado por las ecuaciones

$$\frac{dx}{dt} = f (s_0, x) \cdot e \quad [5.50]$$

$$- \frac{de}{dt} = g (s_0, x) \cdot e^2 \quad [5.51]$$

$$t = 0 \quad x = 0 \quad e = e_{0a} \quad [5.52]$$

ya que como se ha visto en el estudio de la distribución de pesos moleculares esta queda bien caracterizada por el grado de hidrólisis.

Dividiendo las ecuaciones [5.51] y [5.50] para eliminar la variable tiempo

$$- \frac{de}{dx} = \frac{g (s_0, x)}{f (s_0, x)} \cdot e \quad [5.53]$$

$$x = 0 \quad e = e_{0a} \quad [5.54]$$

que en el caso de que el cociente del segundo miembro de [5.53] sea una constante, γ , por integración conduce a

$$e = e_{0a} \exp(-\gamma \cdot x) \quad [5.55]$$

y sustituyendo [5.55] en [5.50]

$$\frac{dx}{dt} = f (s_0, x) \cdot e_{0a} \exp(-\gamma \cdot x) \quad [5.56]$$

expresión que coincide con la ecuación [5.49] si

$$f (s_0, x) = \frac{\beta}{s_0} \quad [5.57]$$

lo que indicaría orden cero de la reacción de hidrólisis respecto al sustrato, es decir, elevada afinidad de la enzima por el sustrato que determina que prácticamente toda la enzima activa esta ligada al sustrato



admitiendo el equilibrio para [5.58]

$$[ES] = K_s [E] [S] \quad [5.59]$$

y realizando un balance de enzima activa

$$[E] + [ES] = e \quad [6.60]$$

$$[E] + K_s [E] [S] = e \quad [5.61]$$

$$[E] = \frac{e}{1 + K_s [S]} \quad [5.62]$$

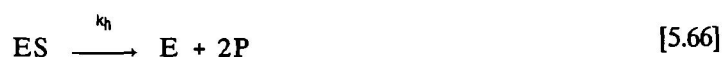
$$[ES] = \frac{K_s [S] e}{1 + K_s [S]} \quad [5.63]$$

por tanto, si K_s es muy elevado las ecuaciones [5.62] y [5.63] se reducen a

$$[E] \approx \frac{e}{K_s [S]} \quad [5.64]$$

$$[ES] \approx e \quad [5.65]$$

y la velocidad de hidrólisis



$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = k_h \cdot [ES] = k_h \cdot e \quad [5.67]$$

con lo que sustituyendo [5.55] en [5.67]

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = k_h \cdot e_{0a} \exp(-\gamma \cdot x) \quad [5.68]$$

que coincide con la ecuación cinética [5.49] encontrada a partir de los resultados experimentales.

Sin embargo, para que el coeficiente de la conversión en la exponencial de [5.49] y [5.68] resulte independiente de la concentración inicial de sustrato como ha resultado en la interpretación de los experimentos realizados, apartado 5.1, es necesario que la forma de $g(s_0, x)$ sea igual que la de $f(s_0, x)$, ecuación [5.57]

$$\gamma = \frac{g(s_0, x)}{f(s_0, x)} \longrightarrow g(s_0, x) \propto \frac{1}{s_0} \quad [5.69]$$

lo que de acuerdo con [5.64] que indica que la concentración de enzima libre es inversamente proporcional a la concentración de sustrato, sugiere que la desnaturalización de segundo orden de la enzima tiene lugar por ataque de la enzima libre a la enzima ligada al sustrato



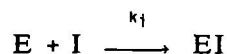
lo que además explicaría que la desnaturalización no se produzca en ausencia del sustrato como se ha demostrado experimentalmente con Protease 660 L. Por tanto, la ecuación cinética de la desnaturalización sería

$$- \frac{de}{dt} = k_d \cdot \frac{e}{s_0} \cdot e \quad [5.71]$$

donde reemplazar la concentración variable $[S]$ de [5.64] por s_0 puede estar justificado porque los péptidos resultantes de la hidrólisis son a su vez sustratos para la hidrólisis y la disminución de la concentración de enlaces peptídicos hidrolizables con el progreso de la hidrólisis puede quedar compensada por la mayor accesibilidad de los mismos al ataque enzimático al quedar localizados en péptidos independientes cada vez más pequeños.

En resumen, la ecuación cinética obtenida [5.43] puede explicarse mediante el siguiente mecanismo:

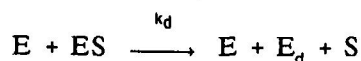
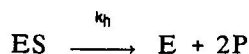
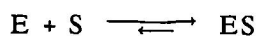
- a) un proceso muy rápido de unión irreversible de la enzima activa a un inhibidor presente en el sustrato



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

$$e_{0a} = e_0 - e \cdot s_0$$

- 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



Mecanismo que conduce a la ecuación cinética:

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = k_h (e_0 - e \cdot s_0) \exp \left(- \frac{k_d}{k_h} x \right) \quad [5.72]$$

Comparando [5.72] y [5.43] se obtienen las siguientes expresiones para los parámetros cinéticos

$$k_h = \beta \quad [5.73]$$

$$e = \frac{\delta}{\beta} \quad [5.74]$$

$$k_d = \gamma \cdot k_h \quad [5.75]$$

que aplicadas a las ecuaciones obtenidas con los tres sistemas considerados, ecuaciones [5.19], [5.23] y [5.27], permite calcular los datos indicados en la tabla 5.22

Tabla 5.22
Determinación de los parámetros cinéticos

Enzima	k_h , g/(UA min)	e , 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
P.E.M. 2500 S	0.171	0.029	8.36

5.4 APLICACION AL ANALISIS DE LA INFLUENCIA DE OTRAS VARIABLES DE OPERACION

La ecuación cinética propuesta en el apartado anterior, [5.72], conduce por integración a

$$x = \frac{k_h}{k_d} \ln \left[1 + k_d \left(\frac{e_0}{s_0} - e \right) t \right] \quad [5.76]$$

que se ha utilizado para el análisis de los resultados obtenidos en los experimentos realizados para estudiar la influencia de otras variables de operación que se describen en el apartado 4.3.

5.4.1 Utilización de mezclas de proteasas comerciales

La aplicación de la ecuación [5.76] a los resultados obtenidos con mezclas de Protease 660 L y P.E.M. 2500 S indicados en las tablas 4.33 y 4.34, determinando los parámetros de esta ecuación por regresión no lineal, conduce a las ecuaciones:

$$\frac{e_0}{s_0} = 0.595 \frac{UA}{g} \quad \longrightarrow \quad x = 0.0328 \ln (1 + 2.50 \cdot t) \quad [5.77]$$

$$\frac{e_0}{s_0} = 1.047 \frac{UA}{g} \quad \longrightarrow \quad x = 0.0334 \ln (1 + 6.00 \cdot t) \quad [5.78]$$

que reproducen muy bien los resultados experimentales como se observa en las figuras 5.41 y 5.42 en las que se representan junto a los puntos experimentales la línea prevista por las ecuaciones anteriores. Por otra parte, el coeficiente del tiempo en el logaritmo del segundo miembro de ambas ecuaciones, admitiendo la relación funcional indicada en la ecuación [5.76] con e_0/s_0 , conduce a

$$k_d \left(\frac{e_0}{s_0} - \epsilon \right) = 7.74 \left(\frac{e_0}{s_0} - 0.272 \right) \quad \text{min}^{-1} \quad [5.79]$$

expresión consistente con esta relación funcional. De manera semejante, tomando el valor medio de los coeficientes del logaritmo del segundo miembro que son prácticamente iguales, resulta

$$k_h = 0.256 \frac{UA}{g \cdot \text{min}} \quad [5.80]$$

Parece lógico que la ecuación cinética deducida para la acción de las proteasas comerciales que son mezclas de diferentes enzimas, permita también ajustar los resultados experimentales de mezclas de estas proteasas comerciales.

Sin embargo, es interesante comparar los valores obtenidos para los parámetros cinéticos con los de las proteasas comerciales cuando actúan independientes indicados en la tabla 5.22. Se observa que el valor de k_h obtenido es superior al de ambas y que el valor de k_d es inferior al de ambas, aunque naturalmente son próximos a los correspondientes a Protease 660 L que es la enzima mayoritaria y la más activa. Por el contrario, el valor de ϵ que es la fracción de actividad enzimática perdida en los momentos iniciales es superior en un orden de magnitud al observado en la actuación de las proteasas comerciales aisladas que hemos explicado por la presencia de un inhibidor irreversible en la lactoalbúmina comercial.

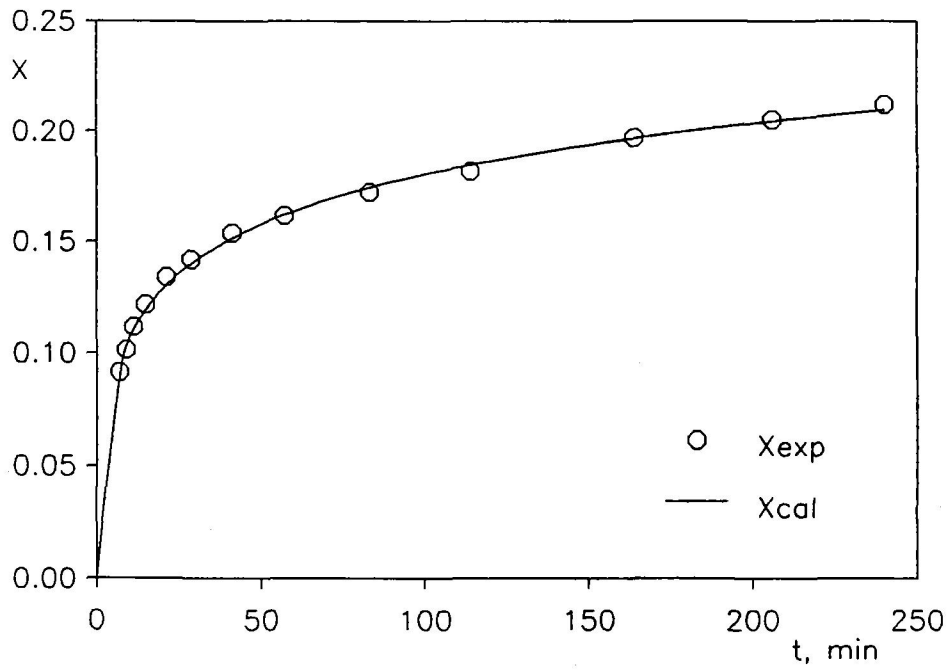


Figura 5.41 Protease 660 L - P.E.M. 2500 S; $e_0 = 65.1$ UA/L $s_0 = 109.5$ g/L

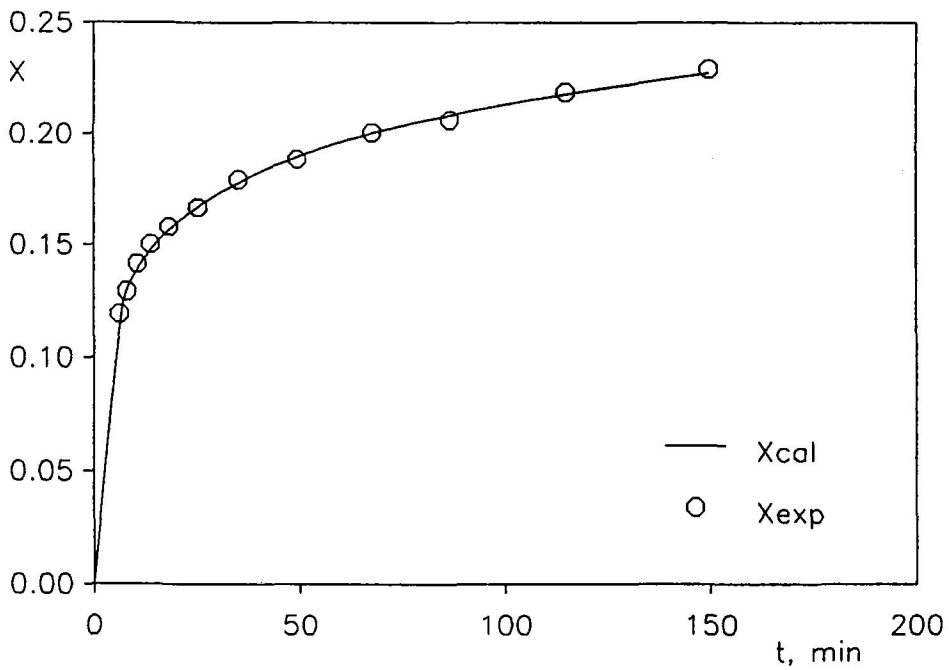


Figura 5.42 Protease 660 L - P.E.M. 2500 S; $e_0 = 114.6$ UA/L $s_0 = 109.5$ g/L

Las variaciones de k_h y k_d indicadas, que favorecen la hidrólisis, indican una acción sinérgica en la actuación simultánea de ambas proteasas comerciales, como sería de esperar dado que contienen enzimas específicas para diferentes enlaces peptídicos. La variación de e , que perjudica la hidrólisis, parece indicar una desnaturalización parcial rápida entre las enzimas mezcladas de diferentes orígenes que es frecuentemente indicada en bibliografía.

Con objeto de determinar cual de los dos efectos indicados es predominante se compara a título de ejemplo los resultados obtenidos en el experimento descrito en la tabla 4.34 con los que sería de esperar si la actuación de la mezcla fuera aditiva. En este caso, la ecuación [5.72] debería escribirse en la forma

$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = k_{h1} (e_{o1} - e_1 s_0) \exp\left(-\frac{k_{d1}}{k_{h1}} x\right) + k_{h2} (e_{o2} - e_2 s_0) \exp\left(-\frac{k_{d2}}{k_{h2}} x\right) \quad [5.81]$$

aunque e_1 y e_2 no corresponderían a los valores indicados en la tabla 5.22 ya que el inhibidor irreversible sólo podría unirse en parte a las enzimas de Protease 660 L y, en parte a las de P.E.M. 2500 S. Sin embargo, el caso más favorable de esta hipótesis aditiva en cuanto al grado de hidrólisis alcanzado se refiere, correspondería a que el inhibidor irreversible se uniera totalmente a las enzimas menos activas que son las del P.E.M. 2500 S

$$\frac{dx}{dt} = 0.241 \left(\frac{99.0}{109.5} \right) \exp\left(-\frac{7.95}{0.241} x\right) + 0.171 \left(\frac{15.6}{109.5} - 0.029 \right) \exp\left(-\frac{8.36}{0.171} x\right)$$

$$\frac{dx}{dt} = 0.218 \exp(-33.0 \cdot x) + 0.0194 \exp(-48.9 \cdot x) \quad [5.82]$$

separando variables e integrando

$$t = \int_0^x \frac{dx}{0.218 \exp(-33.0 \cdot x) + 0.0194 \exp(-48.9 \cdot x)} \quad [5.83]$$

por integración numérica de esta ecuación se obtienen los resultados que se indican en la tabla 5.23 junto con los correspondientes a la ecuación [5.78] obtenida por regresión no lineal de los resultados experimentales.

Se observa en esta tabla que salvo en los momentos iniciales, en que predomina el aumento de e , a partir del 8 % de hidrólisis empieza a predominar el efecto sinérgico de la mezcla provocado por el aumento de k_h y la disminución de k_d .

Es interesante también señalar que la distribución de tamaños moleculares en este experimento indicada en la tabla 4.35 pone de manifiesto que utilizando mezclas de proteasas comerciales disminuye

la fracción de seroalbúmina resistente a la hidrólisis y de manera semejante a los resultados comentados en el apartado 5.2 a partir del 15 % de hidrólisis más del 98 % del hidrolizado está formado por péptidos de tamaño inferior a 3000 Da.

Tabla 5.23
Actuación aditiva de ambas proteasas comerciales

x	t, min ec.[5.83]	t, min ec.[5.78]
0.000	0.00	0.00
0.020	0.12	0.14
0.040	0.36	0.39
0.060	0.83	0.84
0.080	1.74	1.66
0.100	3.53	3.16
0.120	7.00	5.89
0.140	13.74	10.85
0.160	26.82	19.89
0.180	52.19	36.34
0.200	101.34	66.27
0.220	196.57	120.75

5.4.2 Influencia del pH

Con objeto de explorar la influencia de esta variable se realizaron los experimentos cuyos resultados se recogen en las tablas 4.36 y 4.37 a valores del pH de 9 y 10 respectivamente.

Estos resultados se ajustan también a la ecuación [5.76] como se observa en las figuras 5.43 y 5.44 en las que se representan los puntos experimentales junto a las líneas correspondientes a las ecuaciones obtenidas por regresión no lineal

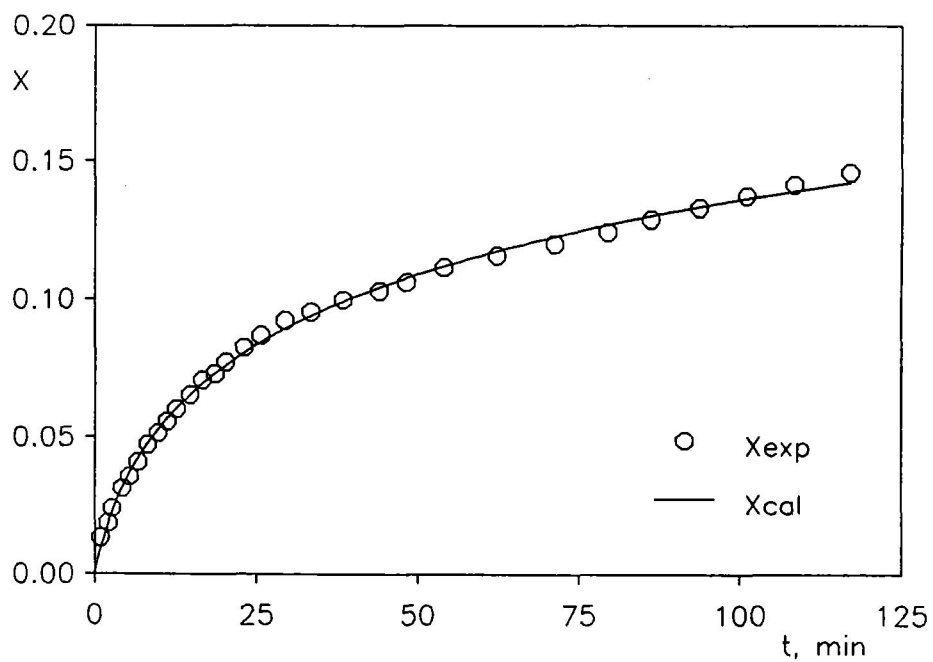


Figura 5.43 Protease 660 L $pH=9.0$

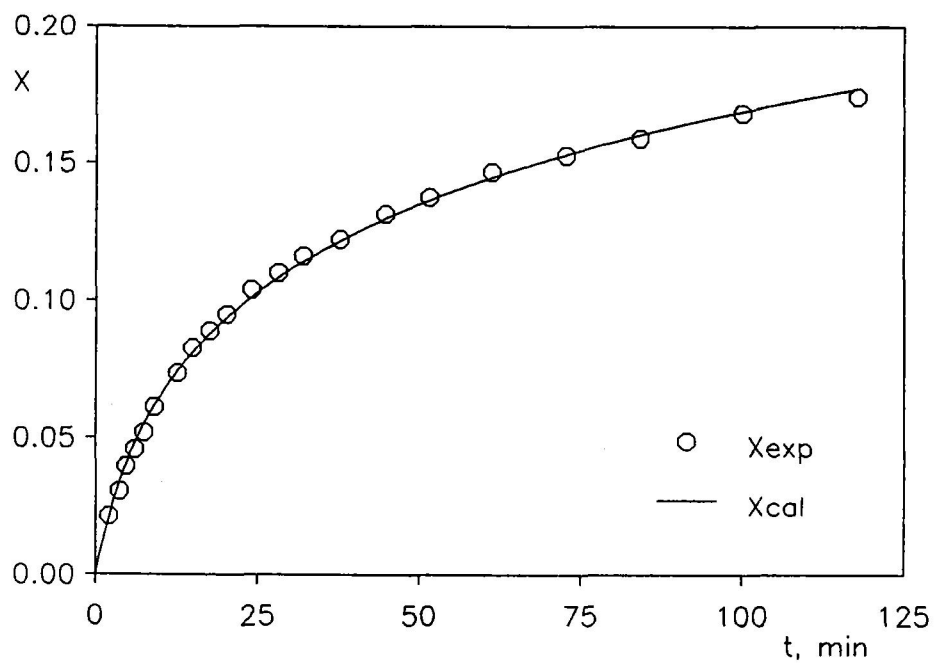


Figura 5.44 Protease 660 L $pH=10.0$

$$\text{pH} = 9.0 \quad \longrightarrow \quad x = 0.0407 \ln (1 + 0.273 \cdot t) \quad [5.84]$$

$$\text{pH} = 10.0 \quad \longrightarrow \quad x = 0.0515 \ln (1 + 0.257 \cdot t) \quad [5.85]$$

resultados que comparados con los correspondientes a pH=8.0 a iguales condiciones experimentales

$$x = 0.0303 \ln (1 + 0.518 \cdot t) \quad [5.86]$$

indican un efecto positivo del aumento del pH sobre la velocidad de hidrólisis, aunque al no haberse analizado todavía la influencia de la concentración inicial de enzima a pH diferentes de 8.0, no es posible obtener a partir de los parámetros de las ecuaciones [5.84] y [5.85] los correspondientes al modelo cinético propuesto: k_h , k_d y e . Aunque comparando con [5.76] pueden obtenerse los resultados que se indican en la tabla 5.24 y que se representan en las figuras 5.45 y 5.46

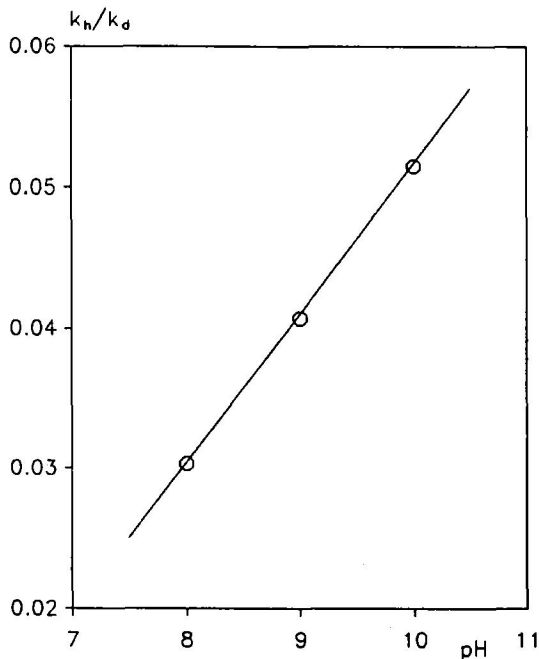


Figura 5.45

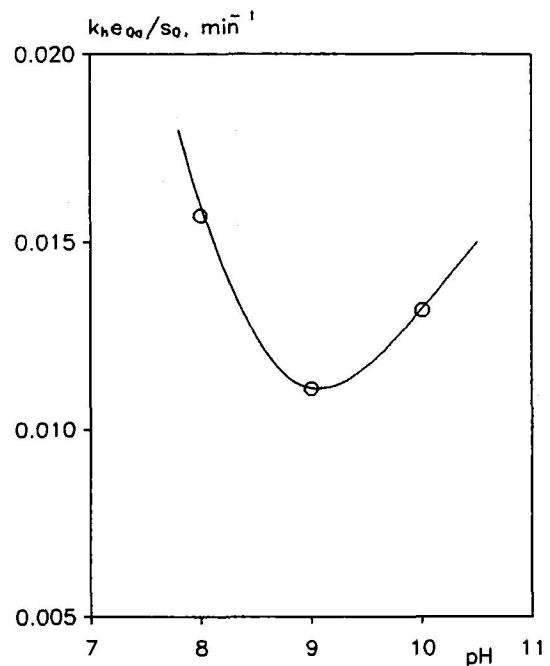


Figura 5.46

Debe tenerse presente, sin embargo, que cuanto mayor sea el pH de operación mayor será el contenido salino del hidrolizado final al neutralizar posteriormente lo que como ya se ha indicado perjudica la calidad del producto que se pretende obtener.

Tabla 5.24

 $e_0 = 3.30 \text{ UA/L}$ $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $T = 50^\circ\text{C}$

pH	k_t/k_d	$k_n e_{0e}/s_0, \text{ min}^{-1}$
8	0.0303	0.0157
9	0.0407	0.0111
10	0.0515	0.0132

5.4.3 Influencia de la temperatura

De manera semejante al apartado anterior, para explorar brevemente la influencia de la temperatura se realizaron los experimentos cuyos resultados se indican en las tablas 4.38 y 4.39 a las temperaturas de 60 y 70°C respectivamente.

Como se observa en las figuras 5.47 y 5.48 también se ajustan a la ecuación [5.76] y por regresión no lineal se obtiene

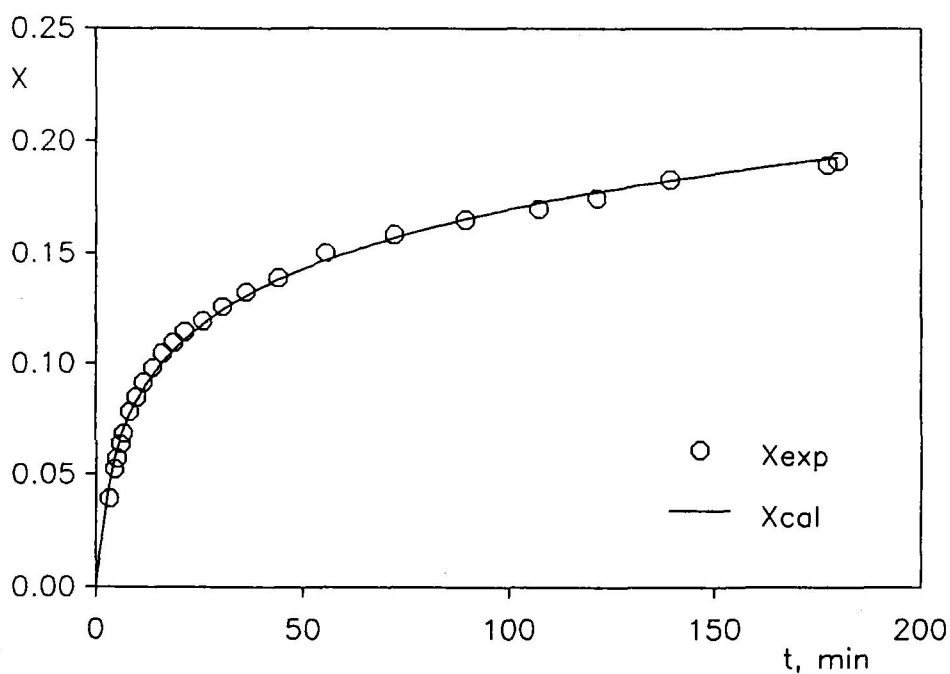


Figura 5.47 Protease 660 L $T = 60^\circ\text{C}$

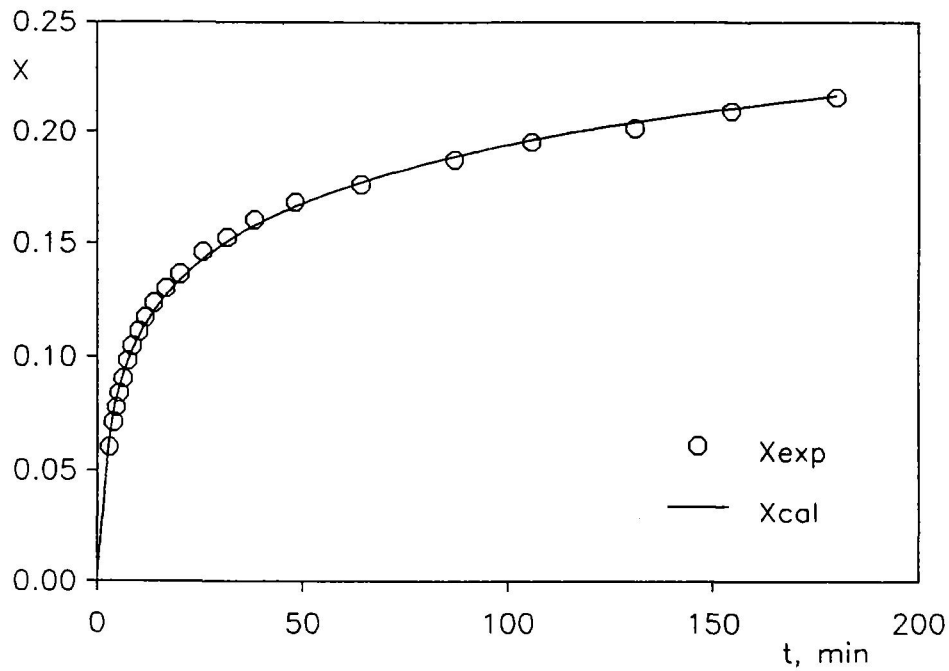


Figura 5.48 Protease 660 L T=70°C

$$T = 60 \text{ } ^\circ\text{C} \quad \longrightarrow \quad x = 0.0394 \ln (1 + 0.737 \cdot t) \quad [5.87]$$

$$T = 70 \text{ } ^\circ\text{C} \quad \longrightarrow \quad x = 0.0380 \ln (1 + 1.638 \cdot t) \quad [5.88]$$

ecuaciones que han servido para representar las líneas continuas en las figuras mencionadas.

En este caso comparando las ecuaciones [5.87] y [5.88] con la ecuación [5.86] favorece la hidrólisis en cuanto al valor del parámetro k_r/k_d , pero es perjudicial con respecto al coeficiente del tiempo en el logaritmo del segundo miembro.

La variación del cociente k_r/k_d con la temperatura, figura 5.49, pone de manifiesto que ambos parámetros cinéticos no son constantes cinéticas simples, ya que este cociente parece pasar por un máximo.

La variación de $k_h e_{0a}/s_0$, figura 5.50, parece ajustarse a la ecuación de Arrhenius, dado que su variación con la temperatura debe estar determinada fundamentalmente por la de k_h

$$k_h \frac{e_{oa}}{s_0} = 2.87 \cdot 10^8 \exp\left(-\frac{63470}{RT}\right), \quad \text{min}^{-1} \quad r^2 = 0.993 \quad [5.89]$$

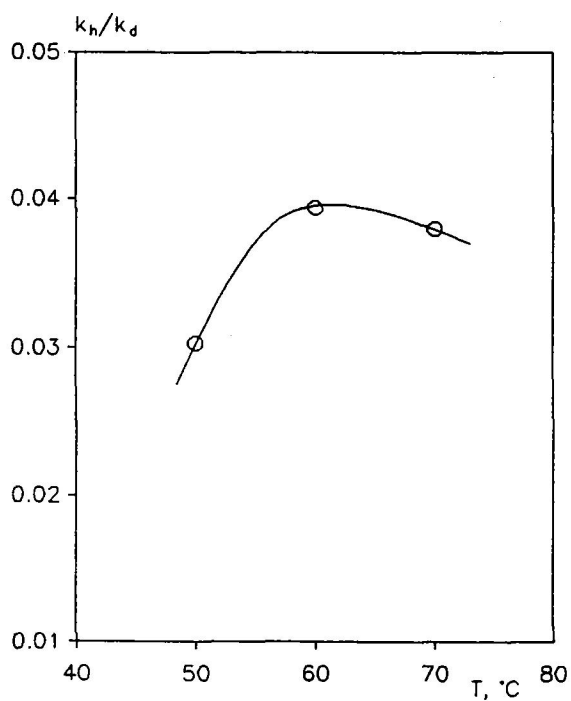


Figura 5.49

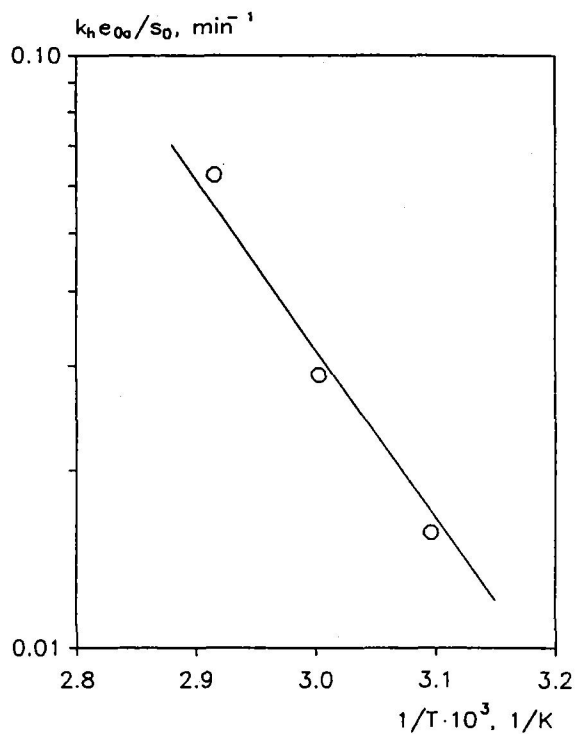


Figura 5.50

6. CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación que se describe en esta Memoria se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1.- La cinética de la hidrólisis de lactoalbúmina comercial con proteasas comerciales (de grado alimentario) de origen bacteriano y animal, así como con mezclas de las mismas, se ajusta a la ecuación de velocidad

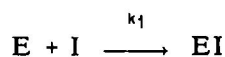
$$r_h = s_0 \frac{dx}{dt} = \beta (e_0 - e \cdot s_0) \exp(- \gamma \cdot x)$$

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

- 2.- 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 recientemente en el suero láctico por Weber y Nielsen. 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.

- 3.- La ecuación cinética indicada en la conclusión 1 se ha explicado mediante el siguiente mecanismo:

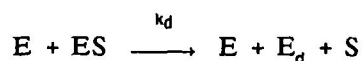
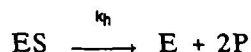
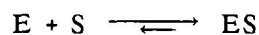
- a) Un proceso muy rápido de unión irreversible de la enzima activa al inhibidor presente en el sustrato



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

$$e_{0a} = e_0 - e \cdot s_0$$

- 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



y se han determinado los parámetros cinéticos: e , k_h y k_d para las tres proteasas comerciales utilizadas en las condiciones de operación, 50°C y pH=8.0, y para las mezclas de proteasas de origen bacteriano y animal.

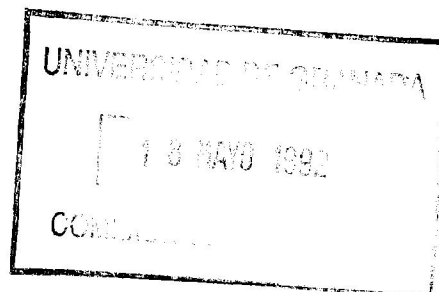
- 4.- Las proteasas bacterianas han resultado ser mucho más eficaces que las proteasas de origen animal, particularmente Alcalasa 0.6 L. En la utilización simultánea de proteasas de origen bacteriano y animal se aprecia una desnaturalización parcial entre ambas en los primeros instantes y un efecto sinérgico importante que llega a predominar sobre la desnaturalización inicial para grados de hidrólisis elevados.
- 5.- El análisis de la distribución de pesos moleculares ha puesto de manifiesto que para cada sistema esta distribución depende exclusivamente del grado de hidrólisis alcanzado.
- 6.- Una fracción de la seroalbúmina presente en el sustrato, del 1 al 3 % de este, resulta resistente a la hidrólisis, siendo el valor mínimo del 1 % el correspondiente a la actuación de Alcalasa 0.6 L. Esta fracción disminuye aún más cuando se emplean mezclas de proteasas de origen bacteriano y animal.
- 7.- Los otros dos componentes principales del sustrato: β -globulina y Ó-lactoalbúmina y los polipéptidos de tamaño equivalente formados en la hidrólisis desaparecen por completo para grados de hidrólisis del orden del 15 % con las proteasas bacterianas y del orden del 10 % con las proteasas de origen animal. Por lo que para grados de hidrólisis superiores al 15 % no existe diferencia aparente entre los hidrolizados obtenidos con proteasas de origen bacteriano y proteasas de origen animal, siendo todos los péptidos de tamaño inferior a 3000 Da, salvo la fracción de seroalbúmina comentada en la conclusión 6.
- 8.- A partir del 15 % de hidrólisis disminuye continuamente la fracción de peso molecular comprendido entre 1000 y 3000 Da y aumenta la fracción de péptidos de tamaño molecular

inferior a 1000 Da. Para grados de hidrólisis superiores al 20 % más del 95 % del hidrolizado está formado por péptidos de tamaño inferior a 1000 Da.

- 9.- El aumento del pH por encima de 8.0 favorece la hidrólisis aunque determina un aumento de la concentración salina del hidrolizado final.
- 10.- El aumento de la temperatura por encima de 50°C también favorece la hidrólisis alcanzando un óptimo alrededor de los 60°C.
- 11.- De acuerdo con los resultados obtenidos las condiciones impuestas a un hidrolizado de proteínas para la preparación de dietas entéricas se consiguen mediante la utilización de proteasas bacterianas hasta superar el 20 % de hidrólisis y ultrafiltración por membranas de peso molecular de corte 1000 Da. En estas condiciones de acuerdo con lo indicado en la conclusión 8, el hidrolizado obtenido debe tener un valor biológico superior al 95 % del de la proteína de partida, aunque esta conclusión esta pendiente de comprobación directa mediante experimentación con animales. En este mismo sentido, la base utilizada para mantener constante el pH durante la hidrólisis y para la neutralización final debe tener una composición que suministre ya algunos iones necesarios en la dieta especial, generalmente una mezcla de KOH y $\text{Ca}(\text{OH})_2$.
- 12.- De acuerdo con la ecuación cinética obtenida la variable intensiva del tratamiento enzimático es

$$\left(\frac{e_0}{s_0} - e \right) \cdot t$$

expresión que permite optimizar las condiciones de operación: e_0 , s_0 y t necesarios para obtener un determinado grado de hidrólisis.



7. NOMENCLATURA

a	parámetro cinético ec. [5.12], min^{-1}
a₁	parámetro cinético ec. [5.28], min^{-1}
a_{1m}	valor de a ₁ calculado con b _{1m}
Abs	absorbancia
a_m	valor de a calculado con b _m
b	parámetro cinético ec. [5.12]
B	consumo de base ec. [3.2], L
b₁	parámetro cinético ec. [5.28]
b_{1m}	valor medio de b ₁
b_m	valor medio de b
DH	grado de hidrólisis %
e	concentración de enzima activa ec. [5.46], UA/L
E	enzima ec. [5.44]
e_o	concentración inicial de enzima, UA/L
e_{oa}	concentración inicial de enzima activa, UA/L
e_{oc}	concentración crítica de enzima ec. [5.36], UA/L
E_d	enzima desactivada
EI	complejo enzima-inhibidor, ec. [5.44]

ES	complejo enzima-sustrato ec. [5.58]
f	factor ponderal de la transformación de nitrógeno en proteína tabla 3.4
h_{tot}	nº de enlaces peptídicos en la proteína tabla 3.9, eq-g/kg
i	concentración de inhibidor ec. [5.46]
I	inhibidor ec. [5.44]
k_d	constante cinética de desnaturalización, g de proteína/UA min
k_h	constante cinética del proceso de hidrólisis, g de proteína/UA min
k_i	constante cinética ec. [5.44], $M^{-1} s^{-1}$
M_p	masa de proteína ec. [3.2], kg
N_B	normalidad de la base ec. [3.2]
P	producto
P_e	presión de entrada, psi
P_f	presión en el manómetro del filtrado, psi
P_s	presión de retenido, psi
r_h	velocidad de hidrólisis, g de proteína/L min
S	sustrato
s_0	concentración inicial de sustrato, g de proteína/L
TCA	ácido tricloroacético

TMP	presión transmembrana, psi
TNBS	ácido 2,4,6 trinitrobencenosulfónico
t_R	tiempo de retención, min
UA	unidad Anson, apartado 3.2.2
x	conversión, DH/100
α	grado de disociación tabla 3.9
β	parámetro cinético ec. [5.43], g de proteína/UA min
γ	parámetro cinético ec. [5.43]
δ	parámetro cinético ec. [5.43], min^{-1}
e	parámetro cinético ec. [5.46], UA/g de proteína

8. BIBLIOGRAFIA

ADLER-NISSEN, J. *Process Biochem.* 12, 18 (1979).

ADU-AMANKWA, B.; CONSTANTINIDES, A. y VIETH, W. R.: *Enzymatic modification of vegetable protein: immobilization of Penicillium duponti enzyme on reconstituted collagen and the use of the immobilized-enzyme complex for solubilizing vegetable protein in a recycle reactor.* *Biotech. Bioeng.* 23, 2609-2627 (1981).

AKUZAWA, R.; ITO, O. y YOKOYAWA, K.: *Degradation of casein by crystalline low-temperature-active proteinase from Streptococcus lactis.* *Japan J. Zootech. Sci.* 56(1), 56-60 (1985).

ANSON, A.: *Modified anson-hemoglobin method for the determination of Proteolytic activity.* *Novo industrias* (1978).

ASSELIN, J.; HERBERT, J. y AMIOT, J.: *Effects of in vitro proteolysis on the allergenicity of major whey proteins.* *J. Food Sci.* 54(4), 1037-1039 (1989).

AUNSTRUP, K.: *Enzymes of industrial interest traditional products; Annual Reports on Fermentation Processes,* Academic Press inc. Vol 1, 181-204 (1977).

BEATTY, K.; BIETH, J. y TRAVIS, J.: *Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized α -1-proteinase inhibitor and α -1-antichymotrypsin.* *J. Biol. Chem.* 255, 3931-3934 (1980).

CAMACHO RUBIO, F.; BRAVO RODRIGUEZ, V. y PAEZ DUEÑAS, M.P.: *Influencia de la desnaturalización de la enzima en la cinética enzimática.* *Afinidad* 45 (418), 506-508 (1988).

CAMUS, M.C.; LAPORTE, J.C. y POCHOLLE, P.: *Protéolyse in vitro de caséine et de gluten par les enzymes pancréatiques.* *Unité de recherches sur la nutrition et l'alimentation*, 1025-1039 (1980).

COGAN, V.; MOSHE, M. y MOKADY, S.: *Debittering and nutritional upgrading of enzymic casein hydrolyzates;* *J. Sci. Food Agric.* 32, 459-466 (1981).

CONSTANTINIDES, A. y ADU-AMANKWA, B.: *Enzymatic modification of vegetable protein: mechanism, kinetics, and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor.* *Biotech. Bioeng.* 22, 1543-1565 (1980).

COOMBS, R.R.A. y McLAUGHLAN, P.: *Allergenicity of food proteins and its possible modification*. *Annals of Allergy*, 53, 592-596 (1984).

CHANG, R.L.: *Process for the preparation of protein for hydrolysis*; United States Patent, 4 482 574 (1984).

CHATAUD, J.; DESREUMAUX, S. y CARTWRIGHT, T.: *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 Europeen A2 0 274 939 (1988 a).

CHATAUD, J.; DESREUMAUX, S. y CARTWRIGHT, T.: *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 Europeen A1 0 274 946 (1988 b).

CHIANG, J.P.; MINGWORTH-ASMUS, B.L. y STERNBERG, M.M.: *Method for the preparation of a protein hydrolyzate from whey protein*; European Patent Application A1 0 065 663 (1982).

CHOBERT, J.M.; BERTRAND-HARB, C. y NICOLAS, M.G.: *Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by tripsin*. *J. Agric. Food Chem.* 36(5), 383-392 (1988).

CHOBERT, J.M.; DALGALARRONDO, M.; DUFOUR, E.; BERTRAND-HARB, C. y HAERTLE, T.: *Influence of pH on the structural changes of β -lactoglobulin studied by tryptic hydrolysis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1077, 31-34 (1991).

De RHAM, O.: *Procédé de préparation d'un produit lactosérique à allergénicité réduite*. European Patent Application A1 0 311 795 (1989).

DRIOU, A.; SAINT-PAUL, F.; PAQUET, D.; Le DEAUT, J.Y. y LINDEN, G.: *Les protéases non coagulantes dans les industries agro-alimentaires: propriétés biochimiques et applications technologiques*. *Ind. Aliment. Agric.*, 102, 311-320 (1985).

DUCROO, P.: *Utilisation industrielle des enzymes*; *Ind. Aliment. Agric.*, 99, 401-412 (1982).

FAIGH, J.G.; STUART, M.J. y TALBOTT, L.L.: *Enzymatic hydrolysis of proteins*. European Patent Application A2 0 325 986 (1989).

- GRIMBLE, G.K.; REES, R.G.; KEOHANE, P.P.; CARTWRIGHT, T.; DESREUMAUX, M. y SILK, D.B.A.: *Effect of peptide chain length on absorption of egg protein hydrolysates in the normal human jejunum*. *Gastroenterology* 92, 136-142 (1987).
- GRIMBLE, G.K.; KEOHANE, P.P.; HIGGINS, B.E.; KAMINSKI, M.V. y SILK, D.B.A.: *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 (1986).
- GUILLOU, H.; MIRANDA, G. y PELISSIER, J. P.: *Hydrolysis of β -casein by gastric proteases*. *Int. J. peptide protein Res.* 37, 494-501 (1991).
- HERBET, A.B. y DUNNILL, P.: *Limited modifications of soya proteins by immobilized subtilisin: comparison of products from different reactor types*. *Biotech. Bioeng.* 32, 475-481 (1989).
- JOST, R.; MEISTER, N. y MONTI, J.C.: *Procédé de préparation d'un hydrolysate de protéines de lactosérum et d'un aliment hypoallergéniques*. Demande de Brevet Europeen A1 0 321 603. Société des produits Nestlé (1989).
- JOST y MONTI: *Whey protein hydrolysis by trypsin*. *J. Dairy Sci.* 60(9), 1387-1393 (1977).
- KLAUS, R.L. y VAN NESS, H.C.: *An extension of the Spline fit technique and applications to thermodynamic data*. *AIChE J.* 13 (6), 1132-1136 (1967).
- KNIGHTS, R.J.: *Processing and evaluation of the antigenicity of protein hydrolysates*. Nutrition for station needs in infance protein hydrolysates. Ed. Fina Lisshlpz, Cap. 8, 105-115 (1985).
- LALASIDIS, G. y SJOBERG, L.B.: *Two new methods of debittering protein hydrolysates and a fraction of hydrolysates with exceptionally high content of essential amino acids*; *J. Agric. Food Chem.*, 26, 742-749 (1978).
- MARKOVIC, I.; TOPOLOVEC, V.; MARIC, V. y JOHANIDES, V.: *The barley protein degradation: Mechanism of protein solubilization during barley mashing with neutral proteinase*. *Biotech. Bioeng.* 32, 18-27 (1988).
- MAUBCIS, J.L.; ROGER, L.; BRULE, G. y PIOT, M.: *Hydrolysate enzymatique total de proteines de lactosérum, obtention et applications*. Demande de Brevet Europeen A1 0 022 019 (1981).

MIETSCH, F.; FEHER, J. y HALASZ, A.: *Investigation of functional properties of partially hydrolyzed proteins*. Die Nahrung 33(1), 9-15 (1989).

MINAGAMA, E.; KAMINOGAWA, S.; TSUKASAKI, F. y YAMANCHI, K.: *Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hidrolysates from milk casein by aminopeptidase T*. J. Food Sci. 54(5), 1225-1229 (1989).

NEY, K.H.: *Bitterness of peptides: amino acid composition and chain length*. ACS Symposium Series, 115, 149-173 (1979).

NOVO INDUSTRIAS: *Use of food grade alcalase or neutrase for controlled enzymatic hydrolysis of proteins*. Información técnica Novo Industrias (1989)

OLOFSSON, M.; BUHLER, M. y WOODS, P.: *A process for the preparation of a purified protein hydrolysate*. UK Patent Application 2 043 651 A (1980).

OTAGIRI, K.; MIYAKE, I.; ISHIBASHI, N.; FUKUI, H.; KANEHISA, H. y OKAI, H.: *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. Japan, 56(4), 1116-1119 (1983).

OTANI, H.; DONG, X.Y. y HOSONO A.: *Preparation of low-immunogenic peptide fragments from milk casein*. Milchwissenschaft 45(4), 217-220 (1990).

PARKER, D.M. y PAWLETT, D.: *Flavour control of protein hydrolysates*. European Patent Application A2 0 223 560 (1987).

POSTOLACHE, C. y ONCESCU, T.: *Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalyzed by alcalase*. Revue Roumaine de Chimie, 34(2), 581-584 (1989).

RICHTER, W.V.; JACOB, B. y SCHWANDT, P.: *Molecular weight determination of peptides by high performance gel chromatography*. Anal. Biochem., 133, 288-291 (1983).

ROGER, L.; BRULE, G. y MAUBOIS, J.L.: *New ways for the utilization of whey proteins, I. Hydrolysis of whey proteins-therapeutic interest*. Technique Laitiere, 952, 65-67 (1981).

- SAMUELSSON, E.G. y POULSEN, O.M.: *A peptide preparation, a process for producing it and use of the peptide preparation*. European Patent Application A1 0 226 221 (1987).
- SANOGO, T.; PAQUET, D. ; AUBERT, F. y LINDEN, G.: *Proteolysis of α_{s1} -casein by papain in a complex environment. Influence of ionic strength on the reaction products*. J. Food Sci. 55(3), 796-800 (1990).
- SANOGO, T.; PAQUET, D. y LINDEN, G.: *Proteolysis of α_{s1} -casein by papain in a complex environment. Influence of ionic strength on the kinetic constants*. J. Food Sci. 55(3), 801-804 y0816 (1990).
- SCHMIDT, D.G. y POLL, J.K.: *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 (1991).
- SNYDER, S.L. y SOBOCINSKY, P.Z.: *An improved 2,4,6 Trinitrobenzenesulfonic Acid Method for the determination of amines*. Anal. Biochem. 64, 284-288 (1975).
- SPREER, E.: *Lactología Industrial*. Editorial Acribia (1973).
- SPRÖSSLER, B. y UHLING, H.: *Method for hydrolysing proteins with proteinase*. German Federal Republic Patent Application, DE 3 003 679 A1 (1981).
- SUZUKI, Y.; FUKUZAKA, T. y SHINDAI, H.: *Method for removing the bitter taste of protein hydrolysates*. Japanese Examined Patent 5 612 084 (1981).
- TAKASE, M.; FUKUWATARI, Y.; KAWASE, K.; KIYOSAWA, J.; OGASA, K.; SUZUKI, S. y KUROUME, T.: *Antigenicity of casein enzymatic hydrolysate*. J. Dairy Sci. 62, 1570-1576 (1979).
- TAO, T.M. y WATSON, A.T.: *An adaptive algorithm for fitting with Splines*. AIChE J. 34 (10), 1722-1725 (1988).
- TOSSAVAINEN, O.; HEIKONEM, M. y LINKO, P.: *Milk protein hydrolysates*. Kemia-Kemi, 10, 963-964 (1983).
- UMETSU, H.; MATSUOKA, H. e ICHISHIMA, E.: *Debittering mechanism of bitter peptides from milk casein by wheat carboxypeptidase*. J. Agric. Food Chem., 31(1), 50-53 (1983).

VEISSEYRE, R.: *Lactología Técnica*. Ed. Acribia. Zaragoza (1980).

WEBER, B.A. y NIELSEN, S.S.: *Isolation and partial characterization of a native serine-type protease inhibitor from bovine milk*. J. Dairy Sci. 74, 764-771 (1991).

9. APENDICE

9.1 AJUSTE CON FUNCIONES SPLINE CUBICAS

Considérese una función spline de 3º orden expresada en la forma:

$$B_k(x) = a_{0k} + a_{1k} \cdot \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) + a_{2k} \cdot \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^2 + a_{3k} \cdot \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^3 \quad [1]$$

para el intervalo k, entre los nodos k y k + 1, de manera que

$$\Delta x_k = x_{k+1} - x_k \quad [2]$$

y tratemos de sustituir los coeficientes a_{0k} , a_{1k} , a_{2k} y a_{3k} por los valores de la función y su derivada segunda en los nodos:

$$y_k = a_{0k} \quad [3]$$

$$y_{k+1} = a_{0k} + a_{1k} + a_{2k} + a_{3k} \quad [4]$$

la segunda derivada viene dada por

$$B_k''(x) = \frac{2a_{2k}}{\Delta x_k^2} + \frac{6a_{3k}}{\Delta x_k^2} \cdot \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) \quad [5]$$

que aplicada en ambos nodos

$$c_k = \frac{2a_{2k}}{\Delta x_k^2} \quad [6]$$

$$c_{k+1} = \frac{2a_{2k}}{\Delta x_k^2} + \frac{6a_{3k}}{\Delta x_k^2} \quad [7]$$

De las ecuaciones [3], [4], [6] y [7] se obtiene:

$$a_{0k} = y_k \quad [8]$$

$$a_{2k} = \frac{c_k \cdot \Delta x_k^2}{2} \quad [9]$$

$$a_{3k} = (c_{k+1} - c_k) \frac{\Delta x_k^2}{6} \quad [10]$$

$$a_{1k} = y_{k+1} - y_k - \frac{\Delta x_k^2}{3} \cdot c_k - \frac{\Delta x_k^2}{6} \cdot c_{k+1} \quad [11]$$

que sustituidos en [1] conducen a:

$$\begin{aligned} B_k(x) = & \left(1 - \frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) \cdot y_k + \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) \cdot y_{k+1} + \\ & + \left[-\frac{\Delta x_k^2}{3} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) + \frac{\Delta x_k^2}{2} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^2 - \frac{\Delta x_k^2}{6} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^3 \right] \cdot c_k + \\ & + \left[-\frac{\Delta x_k^2}{6} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right) + \frac{\Delta x_k^2}{6} \left(\frac{x - x_k}{\Delta x_k} \right)^3 \right] \cdot c_{k+1} \end{aligned} \quad [12]$$

ecuación que como puede comprobarse cumple ya las condiciones de continuidad de la función y de su segunda derivada entre los diferentes intervalos.

La continuidad de la primera derivada exigiría que en cada nodo interno

$$B'_{k-1}(x_k) = B'_k(x_k) \quad k = 2,3 \dots n-1 \quad [13]$$

siendo n el número de nodos.

Derivando [12] se obtiene:

$$\begin{aligned} B'_k(x) = & -\frac{y_k}{\Delta x_k} + \frac{y_{k+1}}{\Delta x_k} + \left[-\frac{\Delta x_k}{3} + \Delta x_k \left(\frac{x - x_k}{x_k} \right) - \frac{\Delta x_k}{2} \left(\frac{x - x_k}{x_k} \right)^2 \right] \cdot c_k \\ & + \left[-\frac{\Delta x_k}{6} + \frac{\Delta x_k}{2} \left(\frac{x - x_k}{x_k} \right)^2 \right] \cdot c_{k+1} \end{aligned} \quad [14]$$

que aplicada al nodo k en los dos polinomios que coinciden en él:

$$B'_{k-1}(x_k) = -\frac{y_{k-1}}{\Delta x_{k-1}} + \frac{y_k}{\Delta x_{k-1}} + \frac{\Delta x_{k-1}}{6} \cdot c_{k-1} + \frac{\Delta x_{k-1}}{3} \cdot c_k \quad [15]$$

$$B'_k(x_k) = - \frac{y_k}{\Delta x_k} + \frac{y_{k+1}}{\Delta x_k} - \frac{\Delta x_k}{3} \cdot c_k - \frac{\Delta x_k}{6} \cdot c_{k+1} \quad [16]$$

y por tanto la ecuación [13] queda en la forma:

$$\begin{aligned} & - \frac{1}{\Delta x_{k-1}} y_{k-1} + \left(\frac{1}{\Delta x_{k-1}} + \frac{1}{\Delta x_k} \right) y_k - \frac{1}{\Delta x_k} y_{k+1} + \\ & + \frac{\Delta x_{k-1}}{6} \cdot c_{k-1} + \left(\frac{\Delta x_{k-1} + \Delta x_k}{3} \right) \cdot c_k + \frac{\Delta x_k}{6} \cdot c_{k+1} = 0 \end{aligned} \quad [17]$$

Se desea determinar los valores de y_k y c_k ($k=1,2 \dots n$) que hacen mínimo

$$F = \sum_{k=1}^{n-1} \sum_{i=1}^{m_k} (y_i - B_k(x_i))^2 \quad [18]$$

siendo m_k el número de puntos experimentales (x_i, y_i) del intervalo k

$$\sum_{k=1}^{n-1} m_k = m \quad [19]$$

sometidos a las restricciones de $n-2$ ecuaciones de la forma [17].

Para ello puede utilizarse el método de los multiplicadores de Lagrange y llamando v_m a las variables: $2n$ (n y_k y n c_k)

$$\frac{\partial F}{\partial v_m} + \sum_{k=1}^{k-2} \lambda_k \frac{\partial \phi_k}{\partial v_m} = 0 \quad [20]$$

donde ϕ_k son las ecuaciones [17] y λ_k los correspondientes multiplicadores de Lagrange.

Se dispone por tanto de $2n$ ecuaciones de la forma [20] y $n-2$ ecuaciones de la forma [17] y $2n$ incógnitas más $n-2$ multiplicadores de Lagrange por lo que el sistema está determinado.

Las $n-2$ ecuaciones de la forma [17] son:

$$\begin{aligned}
& - \frac{1}{\Delta x_1} y_1 + \left(\frac{1}{\Delta x_1} + \frac{1}{\Delta x_2} \right) y_2 - \frac{1}{\Delta x_2} y_3 + \\
& + \frac{\Delta x_1}{6} c_1 + \left(\frac{\Delta x_1 + \Delta x_2}{3} \right) c_2 + \frac{\Delta x_2}{6} c_3 = 0
\end{aligned}$$

⋮

[21]

$$\begin{aligned}
& - \frac{1}{\Delta x_{n-2}} y_{n-2} + \left(\frac{1}{\Delta x_{n-2}} + \frac{1}{\Delta x_{n-1}} \right) y_{n-1} - \frac{1}{\Delta x_{n-1}} y_n + \\
& \Delta \frac{x_{n-2}}{6} c_{n-2} + \left(\frac{\Delta x_{n-2} + \Delta x_{n-1}}{3} \right) c_{n-1} + \frac{\Delta x_{n-1}}{6} c_n = 0
\end{aligned}$$

Las 2n ecuaciones de la forma [20] son:

$$-2 \sum_{k=1}^{n-1} \sum_{l=1}^{m_k} (y_l - B_k(x_l)) \frac{\partial B_k(x_l)}{\partial v_m} + \sum_{k=1}^{k-2} \lambda_k \frac{\partial \phi_k}{\partial v_m} = 0 \quad [22]$$

n de ellas implican derivadas con respecto a y_k y las otras n con respecto a c_k .

Teniendo en cuenta la ecuación [12] cuando las $B_k(x)$ se derivan con respecto de y_k las derivadas son todas nulas menos las de $B_{k-1}(x)$ y $B_k(x)$ y lo mismo pasa cuando se derivan con respecto de c_k , salvo cuando se trata de y_1 y c_1 o de y_n y c_n en que sólo hay un sumando en el sumatorio extendido a todos los intervalos:

$$\frac{\partial B_1(x_1)}{\partial y_1} = 1 - \frac{x_1 - x_1}{\Delta x_1} \quad [23]$$

$$\frac{\partial B_1(x_1)}{\partial c_1} = - \frac{\Delta x_1^2}{3} \left(\frac{x_1 - x_1}{\Delta x_1} \right) + \frac{\Delta x_1^2}{2} \left(\frac{x_1 - x_1}{\Delta x_1} \right)^2 - \frac{\Delta x_1^2}{6} \left(\frac{x_1 - x_1}{\Delta x_1} \right)^3 \quad [24]$$

$$\frac{\partial B_{k-1}(x_k)}{\partial y_k} = \frac{x_k - x_{k-1}}{\Delta x_{k-1}} \quad [25]$$

$$\frac{\partial B_k(x_i)}{\partial y_k} = 1 - \frac{x_i - x_k}{\Delta x_k} \quad [26]$$

$$\frac{\partial B_{k-1}(x_i)}{\partial c_k} = -\frac{\Delta x_{k-1}^2}{6} \left(\frac{x_i - x_{k-1}}{\Delta x_{k-1}} \right) + \frac{\Delta x_{k-1}^2}{6} \left(\frac{x_i - x_{k-1}}{\Delta x_{k-1}} \right)^3 \quad [27]$$

$$\frac{\partial B_k(x_i)}{\partial c_k} = -\frac{\Delta x_k^2}{3} \left(\frac{x_i - x_k}{\Delta x_k} \right) + \frac{\Delta x_k^2}{2} \left(\frac{x_i - x_k}{\Delta x_k} \right)^2 - \frac{\Delta x_k^2}{6} \left(\frac{x_i - x_k}{\Delta x_k} \right)^3 \quad [28]$$

$$\frac{\partial B_{n-1}(x_i)}{\partial y_n} = \frac{x_i - x_{n-1}}{\Delta x_{n-1}} \quad [29]$$

$$\frac{\partial B_{n-1}(x_i)}{\partial c_n} = -\frac{\Delta x_{n-1}^2}{6} \left(\frac{x_i - x_{n-1}}{\Delta x_{n-1}} \right) + \frac{\Delta x_{n-1}^2}{6} \left(\frac{x_i - x_{n-1}}{\Delta x_{n-1}} \right)^3 \quad [30]$$

Reordenando la ecuación [17] nos queda:

$$\begin{aligned} \phi_k &= \frac{\Delta x_k}{6} c_k + \left(\frac{\Delta x_k + \Delta x_{k+1}}{3} \right) c_{k+1} + \frac{\Delta x_{k+1}}{6} c_{k+2} \\ &- \frac{1}{\Delta x_k} y_k + \left(\frac{1}{\Delta x_k} + \frac{1}{\Delta x_{k+1}} \right) y_{k+1} - \frac{1}{\Delta x_{k+1}} = 0 \end{aligned} \quad [31]$$

Por lo que el 2º sumando de la ecuación [20]

$$\sum_{k=1}^{k-2} \lambda_k \frac{\partial \phi_k}{\partial v_m} \quad ; m \ (1, 2, \dots, n); c_1, c_2, \dots, c_k, y_1, y_2, \dots, y_k \quad [32]$$

quedaría

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_1}{\partial c_1} = \lambda_1 \left(\frac{\Delta x_1}{6} \right) \quad [33]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_2}{\partial c_2} = \lambda_1 \left(\frac{\Delta x_1 + \Delta x_2}{3} \right) + \lambda_2 \left(\frac{\Delta x_2}{6} \right) \quad [34]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_3}{\partial c_3} = \lambda_1 \left(\frac{\Delta x_2}{6} \right) + \lambda_2 \left(\frac{\Delta x_2 + \Delta x_3}{3} \right) + \lambda_3 \left(\frac{\Delta x_3}{6} \right) \quad [35]$$

⋮

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_{k-2}}{\partial c_{k-2}} = \lambda_{k-4} \left(\frac{\Delta x_{k-3}}{6} \right) + \lambda_{k-3} \left(\frac{\Delta x_{k-3} + \Delta x_{k-2}}{3} \right) + \lambda_{k-2} \left(\frac{\Delta x_{k-2}}{6} \right) \quad [36]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_{k-1}}{\partial c_{k-1}} = \lambda_{k-3} \left(\frac{\Delta x_{k-2}}{6} \right) + \lambda_{k-2} \left(\frac{\Delta x_{k-2} + \Delta x_{k-1}}{3} \right) \quad [37]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_k}{\partial c_k} = \lambda_{k-2} \left(\frac{\Delta x_{k-1}}{6} \right) \quad [38]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_1}{\partial y_1} = -\lambda_1 \frac{1}{\Delta x_1} \quad [39]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_2}{\partial y_2} = \lambda_1 \left(\frac{1}{\Delta x_1} + \frac{1}{\Delta x_2} \right) - \lambda_2 \frac{1}{\Delta x_2} \quad [40]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_3}{\partial y_3} = -\lambda_1 \frac{1}{\Delta x_2} + \lambda_2 \left(\frac{1}{\Delta x_2} + \frac{1}{\Delta x_3} \right) - \lambda_3 \frac{1}{\Delta x_3} \quad [41]$$

⋮

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_{k-2}}{\partial y_{k-2}} = -\lambda_{k-4} \frac{1}{\Delta x_{k-3}} + \lambda_{k-3} \left(\frac{1}{\Delta x_{k-3}} + \frac{1}{\Delta x_{k-2}} \right) - \lambda_{k-2} \frac{1}{\Delta x_{k-2}} \quad [42]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_{k-1}}{\partial y_{k-1}} = -\lambda_{k-3} \frac{1}{\Delta x_{k-2}} + \lambda_{k-2} \left(\frac{1}{\Delta x_{k-2}} + \frac{1}{\Delta x_{k-1}} \right) \quad [43]$$

$$\sum_{k=1}^{k-2} \frac{\partial \phi_k}{\partial y_k} = - \lambda_{k-2} \frac{1}{\Delta x_{k-1}} \quad [44]$$

Por tanto, la primera ecuación de la forma [22] será ($v_k=y_1$)

$$\begin{aligned} & - 2 \sum_{i=1}^{m_1} \left[y_i - \left(1 - \frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} \right) y_1 - \left(\frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} \right) y_2 - \right. \\ & \left. - \left(- \frac{\Delta x_1^2}{3} \left(\frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} \right) + \frac{\Delta x_1^2}{2} \left(\frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} \right)^2 - \frac{\Delta x_1^2}{6} \left(\frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} \right)^3 \right) \cdot c_1 - \right. \\ & \left. - \left(- \frac{\Delta x_1^2}{6} \left(\frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} \right) + \frac{\Delta x_1^2}{6} \left(\frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} \right)^3 \right) \cdot c_2 \right] \left[\left(1 - \frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} \right) + \lambda_1 \left(- \frac{1}{\Delta x_1} \right) \right] = 0 \end{aligned} \quad [45]$$

Para la segunda ecuación, las ecuaciones [25] y [26] indican que habrá ya dos términos en el sumatorio de intervalos

$$\begin{aligned} & - 2 \sum_{i=1}^{m_1} (y_i - B_1(x_i)) \frac{x_i - x_1}{\Delta x_1} - 2 \sum_{i=1}^{m_2} (y_i - B_2(x_i)) \left(1 - \frac{x_i - x_2}{\Delta x_2} \right) + \\ & + \lambda_1 \left(\frac{1}{\Delta x_1} + \frac{1}{\Delta x_2} \right) - \lambda_2 \left(\frac{1}{\Delta x_2} \right) = 0 \end{aligned} \quad [46]$$

Con objeto de facilitar la notación se empleará

$$\frac{x_i - x_k}{\Delta x_k} = u_{ik} \quad [47]$$

$$\sum_{i=1}^{m_k} u_{ik}^p = sx[k,p]; \quad p \ 1..6, \quad k \ 1..n-1 \quad [48]$$

$$\sum_{i=1}^{m_k} y_i u_{ik}^p = syx[k,p]; \quad p \ 0..3 \quad k \ 1..n-1 \quad [49]$$

Con lo cual las ecuaciones van quedando en la siguiente forma:

$$\begin{aligned}
& (m_1 - 2sx[1,1] + sx[1,2]) y_1 + (sx[1,1] - sx[1,2]) y_2 + \\
& + \frac{\Delta x_1^2}{6} [-2sx[1,1] + 5sx[1,2] - 4sx[1,3] + sx[1,4]] c_1 + \\
& + \frac{\Delta x_1^2}{6} [-sx[1,1] + sx[1,2] + sx[1,3] - sx[1,4]] c_2 - \frac{1}{2 \Delta x_1} \cdot \lambda_1 = syx[1,0] - syx[1,1]
\end{aligned} \tag{22.1}$$

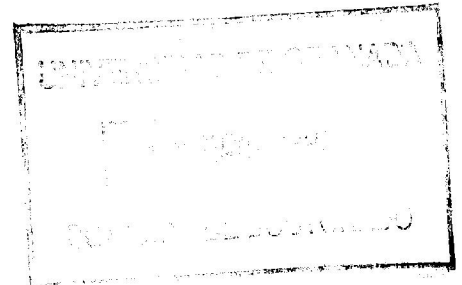
$$\begin{aligned}
& (sx[1,1] - sx[1,2]) y_1 + (sx[1,2] + m_2 - 2sx[2,1] + sx[2,2]) y_2 + (sx[2,1] - sx[2,2]) y_3 + \\
& \frac{\Delta x_1^2}{6} [-2sx[1,2] + 3sx[1,3] - sx[1,4]] c_1 + \left[\frac{\Delta x_1^2}{6} (-sx[1,2] + sx[1,4]) + \right. \\
& \left. + \frac{\Delta x_2^2}{6} (-2sx[2,1] + 5sx[2,2] - 4sx[2,3] + sx[2,4]) \right] c_2 + \\
& + \frac{\Delta x_2^2}{6} [-sx[2,1] + sx[2,2] + sx[2,3] - sx[2,4]] c_3 + \\
& \left(\frac{1}{2 \Delta x_1} + \frac{1}{2 \Delta x_2} \right) \lambda_1 - \frac{1}{2 \Delta x_2} \lambda_2 = syx[1,1] + syx[2,0] - syx[2,1]
\end{aligned} \tag{22.2}$$

$$\begin{aligned}
& (sx[n-1,1] - sx[n-1,2]) y_{n-1} + sx[n-1,2] y_n + \\
& \frac{\Delta x_{n-1}^2}{6} [-2sx[n-1,2] + 3sx[n-1,3] - sx[n-1,4]] c_{n-1} + \\
& + \frac{\Delta x_{n-1}^2}{6} [-sx[n-1,2] + sx[n-1,4]] c_n - \frac{1}{2 \Delta x_{n-1}} \lambda_{n-2} = syx[n-1,1]
\end{aligned} \tag{22.n}$$

Las derivadas con respecto a c_x son más complejas por serlo las ecuaciones [27] y [28], nos quedarían de la forma:

$$\begin{aligned} & \Delta x_1^2 \left[\left(-2sx[1,1] + 5sx[1,2] - 4sx[1,3] + sx[1,4] \right) y_1 + \left(-2sx[1,2] + 3sx[1,3] - sx[1,4] \right) y_2 + \right. \\ & + \frac{\Delta x_1^2}{6} \left(4sx[1,2] - 12sx[1,3] + 13sx[1,4] - 6sx[1,5] + sx[1,6] \right) c_1 + \\ & \left. + \frac{\Delta x_1^2}{6} \left(2sx[1,2] - 3sx[1,3] - sx[1,4] + 3sx[1,5] - sx[1,6] \right) c_2 \right] + \\ & + \frac{\Delta x_1}{2} \lambda_1 = \Delta x_1^2 \left[-2syx[1,1] + 3syx[1,2] - syx[1,3] \right] \end{aligned} \quad [23.1]$$

$$\begin{aligned} & \Delta x_1^2 \left[\left(-sx[1,1] + sx[1,2] + sx[1,3] - sx[1,4] \right) y_1 + \left(-sx[1,2] + sx[1,4] \right) y_2 + \right. \\ & + \Delta x_2^2 \left[\left(-2sx[2,1] + 5sx[2,2] - 4sx[2,3] + sx[2,4] \right) y_2 + \left(-2sx[2,2] + 3sx[2,3] - sx[2,4] \right) y_3 \right] + \\ & + \frac{\Delta x_1^4}{6} \left(2sx[1,2] - 3sx[1,3] - sx[1,4] + 3sx[1,5] - sx[1,6] \right) c_1 + \\ & + \frac{\Delta x_1^4}{6} \left(sx[1,2] - 2sx[1,4] + sx[1,6] \right) c_2 + \\ & + \frac{\Delta x_2^4}{6} \left(4sx[2,2] - 12sx[2,3] + 13sx[2,4] - 6sx[2,5] + sx[2,6] \right) c_2 + \\ & + \frac{\Delta x_2^4}{6} \left(2sx[2,2] - 3sx[2,3] - sx[2,4] + 3sx[2,5] - sx[2,6] \right) c_3 + \\ & + \left(\Delta x_1 + \Delta x_2 \right) \lambda_1 + \frac{\Delta x_2}{2} \lambda_2 = \Delta x_1^2 \left(-syx[1,1] + syx[1,3] \right) + \\ & + \Delta x_2^2 \left(-2syx[2,1] + 3syx[2,2] - syx[2,3] \right) \end{aligned} \quad [23.2]$$



```
PROGRAM AJUSTE_SPLINE3;
(*DISTRIBUCION DE NODOS POR 10 INTERVALOS IGUALES DE LA VARIABLE DEPENDIENTE*)

USES CRT,PRINTER;

LABEL
  1000;

CONST
  NMAX = 10;
  MMAX = 100;
  PRECISION = 1E-12;

TYPE
  REAL = EXTENDED;
  FICHERO = STRING[12];
  VECTORM = ARRAY[1..MMAX] OF REAL;
  VECTORN = ARRAY[1..NMAX] OF REAL;
  MATRIZSX = ARRAY[1..NMAX,0..6] OF REAL;
  MATRIZSYX = ARRAY[1..NMAX,0..3] OF REAL;
  MATRIZB = ARRAY[1..3*NMAX-2,1..3*NMAX-1] OF REAL;
  VECTORR = ARRAY[1..3*NMAX-2] OF REAL;
  VECTORB = ARRAY[1..3*NMAX-2] OF BYTE;

VAR
  DATOS:TEXT;
  NOMBRE_FICHERO:FICHERO;
  X,Y,YCAL,DYCAL:VECTORM;
  FM,CM,E,J,M1,M,N,NE,F,I,ND,IM:BYTE;
  BMAX,SSR,SVP,E0,S0,pH,TEMP,YE,XS,DYS,LIN:REAL;
  DX,XI,C,YK,DYK,A0,A1,A2,A3,YD,XNI:VECTORN;
  SX:MATRIZSX;
  SYX:MATRIZSYX;
  B:MATRIZB;
  JB:VECTORB;
```

```
SOLUCION:VECTORR;
CONT:CHAR;
SISTEMA:BOOLEAN;
```

```
PROCEDURE LEER_DATOS
```

```
(NOMBRE_FICHERO:FICHERO;VAR M:BYTE;VAR E0,S0,pH,TEMP:REAL;VAR X,Y:VECTORM);
```

```
BEGIN
```

```
ASSIGN(DATOS,NOMBRE_FICHERO);
```

```
RESET(DATOS);
```

```
READLN(DATOS,M,E0,S0,pH,TEMP);
```

```
FOR I:=1 TO M DO
```

```
READLN(DATOS,X[I],Y[I]);
```

```
CLOSE(DATOS);
```

```
END;
```

```
FUNCTION POT(BASE:REAL;EXPONENTE:BYTE):REAL;
```

```
BEGIN
```

```
IF BASE=0 THEN POT:=0 ELSE POT:= EXP(EXPONENTE*LN(BASE))
```

```
END;
```

```
PROCEDURE CREAR_INTERVALOS(N,M:BYTE;X:VECTORM;VAR DX,XI:VECTORN);
```

```
BEGIN
```

```
XI[1]:=X[1];
```

```
XI[N]:=X[M];
```

```
FOR I:=2 TO N-1 DO
```

```
XI[I]:=XI[I-1]+(X[M]-X[1])/(N-1);
```

```
FOR I:=1 TO N-1 DO
```

```
DX[I]:=XI[I+1]-XI[I]
```

```
END;
```

```
PROCEDURE CALCULO_SUMATORIOS (N,M:BYTE;X,Y:VECTORM;DX,XI:VECTORN;
```

```
VAR SX:MATRIZSX;VAR SYX:MATRIZSYX);
```

```
VAR
```

```
P:BYTE;
```

```
U:REAL;
```



```

BEGIN
  FOR J:=1 TO N-1 DO
    BEGIN
      FOR P:=0 TO 6 DO
        SX[J,P]:=0.;
      FOR P:=0 TO 3 DO
        SYX[J,P]:=0.
    END;
    SX[1,0]:=1;
    SYX[1,0]:=Y[1];
    I:=1;
    FOR J:=1 TO N-1 DO
      BEGIN
        WHILE (I<=M) AND (X[I]<=XI[J+1]) DO
          BEGIN
            U:=(X[I]-XI[J])/DX[J];
            FOR P:=0 TO 6 DO
              SX[J,P]:=SX[J,P]+POT(U,P);
            FOR P:=0 TO 3 DO
              SYX[J,P]:=SYX[J,P]+Y[I]*POT(U,P);
            I:=I+1;
          END
        END
      END;
    END;

PROCEDURE  MATRIZ_COEFICIENTES(N:BYTE;DX:VECTORN;SX:MATRIZSX;SYX:MA-
TRIZSYX;
VAR B:MATRIZB);
BEGIN
  FOR F:= 1 TO 3*N-2 DO
    FOR I:=1 TO 3*N-1 DO
      B[F,I]:= 0;
      B[1,1]:= POT(DX[1],4)*(4*SX[1,2]-12*SX[1,3]+13*SX[1,4]-6*SX[1,5]+SX[1,6])/6;
      B[1,2]:= POT(DX[1],4)*(2*SX[1,2]-3*SX[1,3]-SX[1,4]+3*SX[1,5]-SX[1,6])/6;
      B[1,N+1]:= POT(DX[1],2)*(-2*SX[1,1]+5*SX[1,2]-4*SX[1,3]+SX[1,4]);
      B[1,N+2]:= POT(DX[1],2)*(-2*SX[1,2]+3*SX[1,3]-SX[1,4]);
    
```

```

B[1,2*N + 1]: = DX[1]/2;
B[1,3*N-1]: = POT(DX[1],2)*(-2*SYX[1,1] + 3*SYX[1,2]-SYX[1,3]);
FOR F: = 2 TO N-1 DO
BEGIN
  B[F,F-1]: = POT(DX[F-1],4)*(2*SX[F-1,2]-3*SX[F-1,3]-SX[F-1,4] + 3*SX[F-1,5]
    -SX[F-1,6])/6;
  B[F,F]: = POT(DX[F-1],4)*(SX[F-1,2]-2*SX[F-1,4] + SX[F-1,6])/6 +
    POT(DX[F],4)*(4*SX[F,2]-12*SX[F,3] + 13*SX[F,4]-6*SX[F,5] + SX[F,6])/6;
  B[F,F + 1]: = POT(DX[F],4)*(2*SX[F,2]-3*SX[F,3]-SX[F,4] + 3*SX[F,5]-SX[F,6])/6;
  B[F,F + N-1]: = POT(DX[F-1],2)*(-SX[F-1,1] + SX[F-1,2] + SX[F-1,3]-SX[F-1,4]);
  B[F,F + N]: = POT(DX[F-1],2)*(-SX[F-1,2] + SX[F-1,4]) +
    POT(DX[F],2)*(-2*SX[F,1] + 5*SX[F,2]-4*SX[F,3] + SX[F,4]);
  B[F,F + N + 1]: = POT(DX[F],2)*(-2*SX[F,2] + 3*SX[F,3]-SX[F,4]);
  B[F,3*N-1]: = POT(DX[F-1],2)*(-SYX[F-1,1] + SYX[F-1,3]) +
    POT(DX[F],2)*(-2*SYX[F,1] + 3*SYX[F,2]-SYX[F,3]);
END;
B[2,2*N + 1]: = DX[1] + DX[2];
B[2,2*N + 2]: = DX[2]/2;
FOR F: = 3 TO N-2 DO
BEGIN
  B[F,F + 2*N-2]: = DX[F-1]/2;
  B[F,F + 2*N-1]: = DX[F-1] + DX[F];
  B[F,F + 2*N]: = DX[F]/2;
END;
B[N-1,3*N-3]: = DX[N-2]/2;
B[N-1,3*N-2]: = DX[N-2] + DX[N-1];
B[N,N-1]: = POT(DX[N-1],4)*(2*SX[N-1,2]-3*SX[N-1,3]-SX[N-1,4] + 3*SX[N-1,5]
  -SX[N-1,6])/6;
B[N,N]: = POT(DX[N-1],4)*(SX[N-1,2]-2*SX[N-1,4] + SX[N-1,6])/6 ;
B[N,2*N-1]: = POT(DX[N-1],2)*(-SX[N-1,1] + SX[N-1,2] + SX[N-1,3]-SX[N-1,4]);
B[N,2*N]: = POT(DX[N-1],2)*(-SX[N-1,2] + SX[N-1,4]);
B[N,3*N-2]: = DX[N-1]/2;
B[N,3*N-1]: = POT(DX[N-1],2)*(-SYX[N-1,1] + SYX[N-1,3]);
B[N + 1,1]: = POT(DX[1],2)*(-2*SX[1,1] + 5*SX[1,2]-4*SX[1,3] + SX[1,4])/6;
B[N + 1,2]: = POT(DX[1],2)*(-SX[1,1] + SX[1,2] + SX[1,3]-SX[1,4])/6;
B[N + 1,N + 1]: = SX[1,0]-2*SX[1,1] + SX[1,2];

```

```

B[N+1,N+2]: = SX[1,1]-SX[1,2];
B[N+1,2*N+1]: = -1/(DX[1]*2);
B[N+1,3*N-1]: = SYX[1,0]-SYX[1,1];
FOR F: = 2 TO N-1 DO
BEGIN
  B[N+F,F-1]: = POT(DX[F-1],2)*(-2*SX[F-1,2]+3*SX[F-1,3]-SX[F-1,4])/6;
  B[N+F,F]: = POT(DX[F-1],2)*(-SX[F-1,2]+SX[F-1,4])/6 +
    POT(DX[F],2)*(-2*SX[F,1]+5*SX[F,2]-4*SX[F,3]+SX[F,4])/6;
  B[N+F,F+1]: = POT(DX[F],2)*(-SX[F,1]+SX[F,2]+SX[F,3]-SX[F,4])/6;
  B[N+F,F+N-1]: = SX[F-1,1]-SX[F-1,2];
  B[N+F,F+N]: = SX[F-1,2]+SX[F,0]-2*SX[F,1]+SX[F,2];
  B[N+F,F+N+1]: = SX[F,1]-SX[F,2];
  B[N+F,3*N-1]: = SYX[F-1,1]+SYX[F,0]-SYX[F,1];
END;
B[N+2,2*N+1]: = 1/(2*DX[1])+1/(2*DX[2]);
B[N+2,2*N+2]: = -1/(DX[2]*2);
FOR F: = 3 TO N-2 DO
BEGIN
  B[N+F,F+2*N-2]: = -1/(DX[F-1]*2);
  B[N+F,F+2*N-1]: = 1/(2*DX[F-1])+1/(2*DX[F]);
  B[N+F,F+2*N]: = -1/(DX[F]*2);
END;
B[2*N-1,3*N-3]: = -1/(DX[N-2]*2);
B[2*N-1,3*N-2]: = 1/(2*DX[N-2])+1/(2*DX[N-1]);
B[2*N,N-1]: = POT(DX[N-1],2)*(-2*SX[N-1,2]+3*SX[N-1,3]-SX[N-1,4])/6;
B[2*N,N]: = POT(DX[N-1],2)*(-SX[N-1,2]+SX[N-1,4])/6 ;
B[2*N,2*N-1]: = SX[N-1,1]-SX[N-1,2];
B[2*N,2*N]: = SX[N-1,2];
B[2*N,3*N-2]: = -1/(DX[N-1]*2);
B[2*N,3*N-1]: = SYX[N-1,1];
FOR F: = 1 TO N-2 DO
BEGIN
  B[2*N+F,F]: = DX[F]/6;
  B[2*N+F,F+1]: = (DX[F]+DX[F+1])/3;
  B[2*N+F,F+2]: = DX[F+1]/6;
  B[2*N+F,N+F]: = -1/DX[F];

```

```

B[2*N + F,N + F + 1]: = 1/DX[F] + 1/DX[F + 1];
B[2*N + F,N + F + 2]: = -1/DX[F + 1];
END;
END;

```

```

PROCEDURE BUSCA_PIVOT_MAXIMO(B:MATRIZB;NE,E:BYTE;VAR FM,CM:BYTE;
VAR BMAX:REAL);
BEGIN
  BMAX: = ABS(B[E,E]);FM: = E;CM: = E;
  FOR F: = E TO NE DO
    FOR I: = E TO NE DO
      BEGIN
        IF ABS(B[F,I]) > BMAX THEN
          BEGIN
            BMAX: = ABS(B[F,I]);FM: = F;CM: = I
          END
        END
      END
    END;
END;

```

```

PROCEDURE CAMBIA_PIVOT_MAXIMO(NE,E,FM,CM:BYTE;VAR JB:VECTORB;VAR
B:MATRIZB);
VAR
  AUXX:BYTE;
  AUXB:REAL;
BEGIN
  IF FM < > E THEN
    BEGIN
      FOR I: = E TO NE + 1 DO
        BEGIN
          AUXB: = B[E,I];B[E,I]: = B[FM,I];B[FM,I]: = AUXB
        END
      END;
    END;
  IF CM < > E THEN
    BEGIN
      AUXX: = JB[CM];JB[CM]: = JB[E];JB[E]: = AUXX;
      FOR F: = 1 TO NE DO

```

```

BEGIN
  AUXB: = B[F,E];B[F,E]: = B[F,CM];B[F,CM]: = AUXB
END
END
END;

```

```

PROCEDURE REDUCCION_GAUSS_JORDAN(NE,E:BYTE;VAR B:MATRIZB);
VAR
  DIVISOR,POR:REAL;
BEGIN
  DIVISOR: = B[E,E];
  FOR I: = E TO NE + 1 DO
    B[E,I]: = B[E,I]/DIVISOR;
  FOR F: = 1 TO NE DO
    BEGIN
      IF F < > E THEN
        BEGIN
          POR: = B[F,E];
          FOR I: = E TO NE + 1 DO
            B[F,I]: = B[F,I]-B[E,I]*POR
          END
        END
      END
    END;

```

```

PROCEDURE GAUSS_JORDAN(NE:BYTE;VAR B:MATRIZB;VAR SOLUCION:VECTORR);
BEGIN
  FOR I: = 1 TO NE DO
    JB[I]: = I;
  FOR E: = 1 TO NE DO
    BEGIN
      BUSCA_PIVOT_MAXIMO(B,NE,E,FM,CM,BMAX);
      IF (BMAX < PRECISION) THEN
        BEGIN
          SISTEMA: = FALSE;
          EXIT;
        END;

```

```

    CAMBIA_PIVOT_MAXIMO(NE,E,FM,CM,JB,B);
    REDUCCION_GAUSS_JORDAN(NE,E,B);
END;
FOR I:=1 TO NE DO
    SOLUCION[JB[I]]:=B[I,NE+1];
    SISTEMA:=TRUE;
END;

```

```

PROCEDURE POLINOMIOS (N:BYTE;DX,XI:VECTORN;SOLUCION:VECTORN;
VAR C,YK,DYK,A0,A1,A2,A3:VECTORN);
BEGIN
    FOR I:=1 TO N DO
        C[I]:=SOLUCION[I];
    FOR I:=N+1 TO 2*N DO
        YK[I-N]:=SOLUCION[I];
    FOR I:=1 TO N-1 DO
        BEGIN
            A0[I]:=YK[I];
            A1[I]:=YK[I+1]-YK[I]-DX[I]*DX[I]*(C[I]/3+C[I+1]/6);
            A2[I]:=C[I]*DX[I]*DX[I]/2;
            A3[I]:=(C[I+1]-C[I])*DX[I]*DX[I]/6;
            DYK[I]:=A1[I]/DX[I];
        END;
        DYK[N]:=(A1[N-1]+2*A2[N-1]+3*A3[N-1])/DX[N-1];
    END;

```

```

PROCEDURE CALIDAD_AJUSTE (M,N:BYTE;DX,XI,A0,A1,A2,A3:VECTORN;
X,Y:VECTORM;VAR SSR,SVP:REAL;VAR YCAL,DYCAL:VECTORM);
VAR
INTP,U:REAL;
BEGIN
    SSR:=0;
    SVP:=0;
    I:=1;
    FOR J:=1 TO N-1 DO
        BEGIN

```

```

INTP: = 4*(A2[J]*A2[J] + 3*A2[J]*A3[J] + 3*A3[J]*A3[J])/POT(DX[J],3);
SVP: = SVP + INTP;
WHILE (I <= M) AND (X[I] <= XI[J + 1]) DO
BEGIN
  U: = (X[I]-XI[J])/DX[J];
  YCAL[I]: = A0[J] + A1[J]*U + A2[J]*U*U + A3[J]*POT(U,3);
  DYCAL[I]: = (A1[J] + 2*A2[J]*U + 3*A3[J]*SQR(U))/DX[J];
  SSR: = SSR + SQR(Y[I]-YCAL[I]);
  I: = I + 1;
END;
END;
END;

PROCEDURE CALCULO_DERIVADAS(M,N:BYTE;DX,XI,YK,A0,A1,A2,A3:VECTORN;
YE:REAL;VAR XS,DYS:REAL);
VAR
SITUACION:BOOLEAN;
SJ:BYTE;
F1,F2,U1,U2,FN,UN:REAL;
BEGIN
  J: = 1;SITUACION: = TRUE;
  WHILE (J <= N) AND (SITUACION) DO
  BEGIN
    IF YE < YK[J] THEN
    BEGIN
      SJ: = J-1;
      SITUACION: = FALSE
    END
    ELSE J: = J + 1
  END;
  F1: = YE-A0[SJ];U1: = 0;
  F2: = YE-A0[SJ]-A1[SJ]-A2[SJ]-A3[SJ];U2: = 1;
  REPEAT
    UN: = U2-(U2-U1)*F2/(F2-F1);
    FN: = YE-A0[SJ]-A1[SJ]*UN-A2[SJ]*SQR(UN)-A3[SJ]*POT(UN,3);
    IF FN < 0 THEN

```

```

BEGIN
  F2: = FN;
  U2: = UN
END ELSE
BEGIN
  F1: = FN;
  U1: = UN
END;
UNTIL ABS(FN) < PRECISION;
XS: = UN*DX[SJ] + XI[SJ];
DYS: = (A1[SJ] + 2*A2[SJ]*UN + 3*A3[SJ]*SQR(UN))/DX[SJ];
END;

BEGIN
  CLRSCR;
  WRITELN('INTRODUCIR NOMBRE DEL FICHERO DE DATOS');
  READLN(NOMBRE_FICHERO);
  LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO,M,E0,S0,pH,TEMP,X,Y);
  N: = 11;
  1000:N: = N-1;
  CREAR_INTERVALOS(N,M,X,DX,XI);
  REPEAT
    CONT: = 'N';
    CALCULO_SUMATORIOS(N,M,X,Y,DX,XI,SX,SYX);
    MATRIZ_COEFICIENTES(N,DX,SX,SYX,B);
    GAUSS_JORDAN(3*N-2,B,SOLUCION);
    IF NOT(SISTEMA) THEN GOTO 1000;
    POLINOMIOS(N,DX,XI,SOLUCION,C,YK,DYK,A0,A1,A2,A3);
    FOR I: = 2 TO N-1 DO
      YD[I]: = YK[1] + ((YK[N]-YK[1])/(N-1))*(I-1);
    FOR I: = 2 TO N-1 DO
      CALCULO_DERIVADAS(M,N,DX,XI,YK,A0,A1,A2,A3,YD[I],XNI[I],DYS);
    FOR I: = 2 TO N-1 DO
      IF ABS((XNI[I]-XI[I])/XI[I]) > 0.001 THEN CONT: = 'Y';
    FOR I: = 2 TO N-1 DO
      XI[I]: = XNI[I];

```



```

FOR I: = 1 TO N-1 DO
  DX[I]: = XI[I + 1]-XI[I]
UNTIL CONT < > 'Y';
CALIDAD_AJUSTE(M,N,DX,XI,A0,A1,A2,A3,X,Y,SSR,SVP,YCAL,DYCAL);
SSR: = SSR/(M-N);
SVP: = SVP/(((SQR(C[1]) + SQR(C[N]))/2)*(X[M]-X[1]));
WRITELN(LST,'          TABLA 8. ');
WRITELN(LST,'          -----');
WRITELN(LST,'          LACTOALBUMINA 75L - PEM 2500S');
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,' T = 50°C  pH = 8.0  ',S0 = ',S0:4:2,' g/L ',E0 = ',E0:5:3,' UA/L ');
WRITELN(LST);
{WRITELN(LST,'          SSR = ',SSR:12,'  SVP = ',SVP:12,' N = ',N);}
WRITELN(LST,'          t, min. ', x ',          dx/dt, 1/min. ');
WRITELN(LST,'          -----          -----          -----');
YE: = 0.005;
WHILE (YE < YK[N]) DO
  BEGIN
  IF (YE > YK[1]) THEN
  BEGIN
    CALCULO_DERIVADAS(M,N,DX,XI,YK,A0,A1,A2,A3,YE,XS,DYS);
    WRITELN(LST,XS:15:2,YE:15:3,DYS:15:6);
    WRITELN(LST)
  END;
  YE: = YE + 0.005;
  END;
END.

```

9.2 METODO DIFERENCIAL

A continuación se indican los resultados obtenidos en el ajuste con splines cúbicas de los experimentos realizados, salvo los que, a título de ejemplo, se encuentran indicados en la parte 5 de esta Memoria.

Tabla 9.1
 Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 2.475$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
1.95	0.015	0.003354
3.51	0.020	0.003079
5.17	0.025	0.002987
6.82	0.030	0.003062
8.46	0.035	0.003035
10.15	0.040	0.002840
12.03	0.045	0.002483
14.20	0.050	0.002151
16.68	0.055	0.001897
19.45	0.060	0.001716
22.55	0.065	0.001512
26.14	0.070	0.001272
30.53	0.075	0.001015
36.14	0.080	0.000785
43.26	0.085	0.000646
51.61	0.090	0.000555
61.41	0.095	0.000469
73.03	0.100	0.000396
86.75	0.105	0.000337
102.60	0.110	0.000300
119.63	0.115	0.000289
137.39	0.120	0.000273
156.54	0.125	0.000247
178.34	0.130	0.000211
204.63	0.135	0.000169
239.91	0.140	0.000115

Tabla 9.2

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 3.30$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
2.73	0.025	0.004908
3.65	0.030	0.005765
4.53	0.035	0.005454
5.55	0.040	0.004364
6.86	0.045	0.003344
8.55	0.050	0.002686
10.51	0.055	0.002439
12.66	0.060	0.002204
15.05	0.065	0.001987
17.71	0.070	0.001777
20.72	0.075	0.001554
24.21	0.080	0.001315
28.42	0.085	0.001069
33.70	0.090	0.000841
40.37	0.095	0.000679
48.45	0.100	0.000565
58.21	0.105	0.000467
69.79	0.110	0.000406
82.89	0.115	0.000357
98.15	0.120	0.000297
117.55	0.125	0.000220
143.38	0.130	0.000183
167.95	0.135	0.000238

Tabla 9.3
 Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 81.16$ g/L $e_0 = 3.30$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
3.83	0.015	0.002207
6.42	0.020	0.001796
9.25	0.025	0.001701
12.48	0.030	0.001353
16.89	0.035	0.000982
22.09	0.040	0.000998
27.07	0.045	0.000976
32.88	0.050	0.000731
41.10	0.055	0.000530
50.54	0.060	0.000538
60.14	0.065	0.000488
72.04	0.070	0.000359
88.26	0.075	0.000276
107.27	0.080	0.000247
129.85	0.085	0.000192
159.19	0.090	0.000166

Tabla 9.4

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $\text{pH} = 8.0$ $s_0 = 81.16 \text{ g/L}$ $e_0 = 4.950 \text{ UA/L}$

t, min	x	dx/dt, 1/min
1.78	0.010	0.003810
3.35	0.015	0.002823
5.09	0.020	0.002871
7.00	0.025	0.002299
9.43	0.030	0.001967
11.90	0.035	0.002001
14.69	0.040	0.001554
18.10	0.045	0.001515
21.23	0.050	0.001586
24.84	0.055	0.001171
29.89	0.060	0.000886
36.00	0.065	0.000747
43.67	0.070	0.000552

Tabla 9.5
 Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 128.91$ g/L $e_0 = 4.950$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
4.46	0.010	0.001557
7.84	0.015	0.001408
11.59	0.020	0.001258
15.81	0.025	0.001120
20.52	0.030	0.001003
25.97	0.035	0.000825
32.73	0.040	0.000680
40.35	0.045	0.000628
49.25	0.050	0.000484
61.57	0.055	0.000352
76.82	0.060	0.000303
95.69	0.065	0.000229
119.48	0.070	0.000209

Tabla 9.6

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 1.59$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
0.90	0.005	0.005916
1.85	0.010	0.004615
3.11	0.015	0.003446
4.74	0.020	0.002842
6.57	0.025	0.002637
8.54	0.030	0.002433
10.69	0.035	0.002232
13.04	0.040	0.002022
15.66	0.045	0.001789
18.68	0.050	0.001527
22.27	0.055	0.001276
26.53	0.060	0.001087
31.34	0.065	0.001011
36.45	0.070	0.000944
42.04	0.075	0.000837
48.65	0.080	0.000673
57.27	0.085	0.000500
68.95	0.090	0.000378
82.47	0.095	0.000377
95.67	0.100	0.000376
109.48	0.105	0.000343
125.72	0.110	0.000273
146.50	0.115	0.000216
170.51	0.120	0.000211

Tabla 9.7
 Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 3.18$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
1.66	0.015	0.010114
2.20	0.020	0.008490
2.85	0.025	0.006912
3.66	0.030	0.005546
4.64	0.035	0.004770
5.72	0.040	0.004481
6.88	0.045	0.004177
8.13	0.050	0.003851
9.49	0.055	0.003494
11.00	0.060	0.003111
12.72	0.065	0.002730
14.68	0.070	0.002370
16.95	0.075	0.002059
19.53	0.080	0.001833
22.42	0.085	0.001640
25.66	0.090	0.001449
29.35	0.095	0.001268
33.58	0.100	0.001105
38.42	0.105	0.000961
44.05	0.110	0.000820
50.69	0.115	0.000692
58.53	0.120	0.000594
67.39	0.125	0.000540
77.10	0.130	0.000491
87.83	0.135	0.000441
99.89	0.140	0.000389
113.68	0.145	0.000337
129.54	0.150	0.000299
146.66	0.155	0.000291
163.25	0.160	0.000317
177.93	0.165	0.000368

Tabla 9.8

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 18.73$ g/L $e_0 = 3.18$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
2.81	0.040	0.011533
3.27	0.045	0.010334
3.78	0.050	0.009158
4.36	0.055	0.008043
5.03	0.060	0.007054
5.78	0.065	0.006299
6.61	0.070	0.005732
7.53	0.075	0.005169
8.55	0.080	0.004619
9.70	0.085	0.004100
11.00	0.090	0.003637
12.46	0.095	0.003243
14.10	0.100	0.002854
15.98	0.105	0.002470
18.17	0.110	0.002104
20.76	0.115	0.001787
23.76	0.120	0.001560
27.20	0.125	0.001351
31.23	0.130	0.001142
36.05	0.135	0.000941
41.94	0.140	0.000770
48.96	0.145	0.000672
56.76	0.150	0.000612
65.32	0.155	0.000557
74.75	0.160	0.000507
85.06	0.165	0.000465
96.18	0.170	0.000437
107.92	0.175	0.000414
120.42	0.180	0.000384
134.12	0.185	0.000344
149.88	0.190	0.000289
170.15	0.195	0.000202

Tabla 9.9
 Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 1.58 \text{ UA/L}$

t, min	x	dx/dt, 1/min
3.29	0.010	0.001761
6.57	0.015	0.001363
10.48	0.020	0.001195
15.04	0.025	0.000997
20.64	0.030	0.000805
27.37	0.035	0.000699
35.00	0.040	0.000611
44.02	0.045	0.000498
55.29	0.050	0.000398
69.01	0.055	0.000337
84.72	0.060	0.000305
101.62	0.065	0.000282
121.51	0.070	0.000214
151.65	0.075	0.000131

Tabla 9.10

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $\text{pH} = 8.0$ $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 3.94 \text{ UA/L}$

t, min	x	dx/dt, 1/min
1.32	0.010	0.006436
2.21	0.015	0.004867
3.42	0.020	0.003573
4.94	0.025	0.003104
6.64	0.030	0.002776
8.58	0.035	0.002387
10.90	0.040	0.001926
13.86	0.045	0.001482
17.73	0.050	0.001151
22.41	0.055	0.000994
27.88	0.060	0.000835
34.56	0.065	0.000669
43.21	0.070	0.000494
55.80	0.075	0.000314
76.79	0.080	0.000200
104.66	0.085	0.000160
141.59	0.090	0.000112

Tabla 9.11
 Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 8.06$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
2.61	0.030	0.007571
3.36	0.035	0.005798
4.35	0.040	0.004489
5.58	0.045	0.003683
7.11	0.050	0.002913
9.04	0.055	0.002317
11.43	0.060	0.001889
14.42	0.065	0.001476
18.30	0.070	0.001138
23.28	0.075	0.000880
30.01	0.080	0.000622
39.79	0.085	0.000438
52.41	0.090	0.000358
68.07	0.095	0.000286
87.48	0.100	0.000237
110.04	0.105	0.000205
137.38	0.110	0.000159
179.69	0.115	0.000074

Tabla 9.12

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 10.50$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
1.97	0.030	0.007753
2.65	0.035	0.006912
3.42	0.040	0.006069
4.31	0.045	0.005241
5.35	0.050	0.004450
6.58	0.055	0.003671
8.11	0.060	0.002919
10.05	0.065	0.002300
12.45	0.070	0.001880
15.47	0.075	0.001450
19.54	0.080	0.001036
25.25	0.085	0.000768
32.65	0.090	0.000589
42.92	0.095	0.000396
59.95	0.100	0.000222
83.98	0.105	0.000212
107.65	0.110	0.000206
133.89	0.115	0.000170

Tabla 9.13
 Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 18.73$ g/L $e_0 = 8.06$ UA/L

t, min	x	dx/dt, 1/min
1.24	0.035	0.008395
1.80	0.040	0.009467
2.32	0.045	0.009648
2.85	0.050	0.009007
3.45	0.055	0.007474
4.21	0.060	0.005744
5.25	0.065	0.003995
6.81	0.070	0.002706
8.87	0.075	0.002158
11.56	0.080	0.001579
15.50	0.085	0.001016
21.49	0.090	0.000732
29.31	0.095	0.000553
40.42	0.100	0.000359
59.93	0.105	0.000190
87.86	0.110	0.000172
118.73	0.115	0.000151
156.33	0.120	0.000113

9.3 METODO INTEGRAL

Programas en Turbo Pascal 5.0 de regresión no lineal utilizados en la interpretación de los resultados

$$\text{ecuación: } x = \frac{1}{b} \ln(1 + a \cdot b \cdot t)$$

```
PROGRAM REGRESION_NO_LINEAL_2_PARAMETROS;
{ECUACION: x = (1/b)*LN(1+a*b*t)}
```

```
USES PRINTER,CRT;
```

```
CONST
```

```
NMAX = 10;
```

```
NDAT = 100;
```

```
PRECISION = 1E-12;
```

```
TYPE
```

```
REAL = EXTENDED;
```

```
VECTORB = ARRAY[1..NMAX] OF BYTE;
```

```
VECTORR = ARRAY[1..NMAX] OF REAL;
```

```
MATRIZR = ARRAY[1..NMAX,1..NMAX + 1] OF REAL;
```

```
FICHERO = STRING[12];
```

```
VECTORDAT = ARRAY[1..NDAT] OF REAL;
```

```
VAR
```

```
N,M,I,E,FM,CM,F,C:BYTE;
```

```
BMAX,A1,A2,A1M,FF,FA1,FA2:REAL;
```

```
JB:VECTORB;
```

```
B:MATRIZR;
```

```
SOLUCION:VECTORR;
```

```
NOMBRE_FICHERO:FICHERO;
```

```
DATOS:TEXT;
```

```
X,Y,YC:VECTORDAT;
CONT:CHAR;
```

```
PROCEDURE LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO:FICHERO;VAR M:BYTE;VAR X,Y:VECTORDAT);
```

```
BEGIN
```

```
    ASSIGN(DATOS,NOMBRE_FICHERO);
```

```
    RESET(DATOS);
```

```
    READLN(DATOS,M);
```

```
    FOR I:=1 TO M DO
```

```
        READLN(DATOS,X[I],Y[I]);
```

```
    CLOSE(DATOS);
```

```
END;
```

```
PROCEDURE SUMATORIOS_RNL2(X,Y:VECTORDAT;M:BYTE;A1,A2:REAL;VAR B:MATRIZR);
```

```
BEGIN
```

```
    FOR F:=1 TO 2 DO
```

```
        FOR C:=F TO 3 DO
```

```
            B[F,C]:=0;
```

```
        FOR I:=1 TO M DO
```

```
            BEGIN
```

```
                FF:=Y[I]-LN(1+A1*A2*X[I])/A2;
```

```
                FA1:=-X[I]/(1+A1*A2*X[I]);
```

```
                FA2:=LN(1+A1*A2*X[I])/SQR(A2)-A1*X[I]/((1+A1*A2*X[I])*A2);
```

```
                B[1,1]:=B[1,1]+SQR(FA1);
```

```
                B[1,2]:=B[1,2]+FA1*FA2;
```

```
                B[1,3]:=B[1,3]+FA1*FF;
```

```
                B[2,2]:=B[2,2]+SQR(FA2);
```

```
                B[2,3]:=B[2,3]+FA2*FF
```

```
            END;
```

```
        FOR F:=2 TO 2 DO
```

```
            FOR C:=1 TO F-1 DO
```

```
                B[F,C]:=B[C,F]
```

```
END;
```



```

PROCEDURE BUSCA_PIVOT_MAXIMO
(B:MATRIZR;N,E:BYTE;VAR FM,CM:BYTE;VAR BMAX:REAL);
BEGIN
  BMAX:=ABS(B[E,E]);FM:=E;CM:=E;
  FOR F:=E TO N DO
  FOR C:=E TO N DO
  BEGIN
    IF ABS(B[F,C])>BMAX THEN
    BEGIN
      BMAX:=ABS(B[F,C]);FM:=F;CM:=C
    END
  END
END;

```

```

PROCEDURE CAMBLA_PIVOT_MAXIMO
(N,E,FM,CM:BYTE;VAR JB:VECTORB;VAR B:MATRIZR);
VAR
AUXX:BYTE;
AUXB:REAL;
BEGIN
  IF FM<>E THEN
  BEGIN
    FOR C:=E TO N+1 DO
    BEGIN
      AUXB:=B[E,C];B[E,C]:=B[FM,C];B[FM,C]:=AUXB
    END
  END;
  IF CM<>E THEN
  BEGIN
    AUXX:=JB[CM];JB[CM]:=JB[E];JB[E]:=AUXX;
    FOR F:=1 TO N DO
    BEGIN
      AUXB:=B[F,E];B[F,E]:=B[F,CM];B[F,CM]:=AUXB
    END
  END
END;

```

PROCEDURE REDUCCION_GAUSS_JORDAN

(N,E:BYTE;VAR B:MATRIZR);

VAR

DIVISOR,POR:REAL;

BEGIN

 DIVISOR: = B[E,E];

 FOR C: = E TO N + 1 DO

 B[E,C]: = B[E,C]/DIVISOR;

 FOR F: = 1 TO N DO

 BEGIN

 IF F < > E THEN

 BEGIN

 POR: = B[F,E];

 FOR C: = E TO N + 1 DO

 B[F,C]: = B[F,C]-B[E,C]*POR

 END

 END

END;

PROCEDURE GAUSS_JORDAN(N:BYTE;VAR B:MATRIZR;VAR SOLUCION:VECTORR);

BEGIN

 FOR I: = 1 TO N DO

 JB[I]: = I;

 FOR E: = 1 TO N DO

 BEGIN

 BUSCA_PIVOT_MAXIMO(B,N,E,FM,CM,BMAX);

 IF (BMAX < PRECISION) THEN

 BEGIN

 WRITELN('SISTEMA INDETERMINADO');

 HALT;

 END;

 CAMBIA_PIVOT_MAXIMO(N,E,FM,CM,JB,B);

 REDUCCION_GAUSS_JORDAN(N,E,B);

 END;

 FOR I: = 1 TO N DO

 SOLUCION[JB[I]]: = B[I,N + 1];

END;

PROCEDURE RECALCULO_A1(X,Y:VECTORDAT;M:BYTE;A2:REAL;VAR A1M:REAL);

BEGIN

A1M:=0;

FOR I:=1 TO M DO

A1M:=A1M+(EXP(A2*Y[I])-1)/(A2*X[I]);

A1M:=A1M/M

END;

BEGIN

WRITE('REGRESION NO LINEAL (A) O RECALCULO (B): ');

READLN(CONT);

IF (CONT='A') THEN

BEGIN

WRITE('INTRODUCIR VALORES INICIALES a Y b: ');

READLN(A1,A2);

WRITE('INTRODUCIR NOMBRE DEL FICHERO DE DATOS: ');

READLN(NOMBRE_FICHERO);

WRITELN(LST,NOMBRE_FICHERO);

WRITELN(LST,'VALORES INICIALES DE LOS PARAMETROS:');

WRITELN(LST,' a = ',A1:8:4,' b = ',A2:8:4);

LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO,M,X,Y);

REPEAT

SUMATORIOS_RNL2(X,Y,M,A1,A2,B);

GAUSS_JORDAN(2,B,SOLUCION);

A1:=A1-SOLUCION[1];

A2:=A2-SOLUCION[2];

WRITELN(LST,'NUEVOS VALORES DE LOS PARAMETROS:');

WRITELN(LST,' a = ',A1:8:4,' b = ',A2:8:4);

WRITELN('NUEVOS VALORES DE LOS PARAMETROS:');

WRITELN(A1:10:4,A2:10:4);

WRITE('CONTINUAR (Y/N): ');

READLN(CONT)

UNTIL (CONT='N');

WRITELN(LST);

```

WRITELN(LST,'VALORES CALCULADOS CON LA ECUACION OBTENIDA:');
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,' t, min. ',' xexp ',' xcalc ');
WRITELN(LST,' -----',' -----',' -----');
FOR I:=1 TO M DO
BEGIN
  YC[I]:=LN(1+A1*A2*X[I])/A2;
  WRITELN(LST,X[I]:11:2,Y[I]:11:4,YC[I]:11:4)
END
END;
IF (CONT='B') THEN
BEGIN
  WRITE('INTRODUCIR VALOR DE b: ');
  READLN(A2);
  REPEAT
    WRITE('INTRODUCIR NOMBRE DEL FICHERO DE DATOS: ');
    READLN(NOMBRE_FICHERO);
    LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO,M,X,Y);
    RECALCULO_A1(X,Y,M,A2,A1M);
    WRITELN(LST);
    WRITE('am = ',A1M:8:4);
    WRITELN(LST,NOMBRE_FICHERO);
    WRITELN(LST,'VALOR MEDIO DE a RECALCULADO:');
    WRITELN(LST,' b = ',A2:8:4,' am = ',A1M:8:4);
    A1:=A1M;
    WRITELN(LST);
    WRITELN(LST,'VALORES CALCULADOS CON LA ECUACION OBTENIDA:');
    WRITELN(LST);
    WRITELN(LST,' t, min. ',' xexp ',' xcalc ');
    WRITELN(LST,' -----',' -----',' -----');
    FOR I:=1 TO M DO
    BEGIN
      YC[I]:=LN(1+A1*A2*X[I])/A2;
      WRITELN(LST,X[I]:11:2,Y[I]:11:4,YC[I]:11:4)
    END;
    WRITE('CONTINUAR (Y/N): ');

```

```

    READLN(CONT)
  UNTIL (CONT = 'N')
END
END.

```

ecuación
$$t = t_0 + \int_{x_0}^x \frac{\exp(a_2 \cdot x)}{x}$$

```

PROGRAM REGRESION_NO_LINEAL_2_PARAMETROS;
{ECUACION: t = to+INTEGRAL(EXP(A2*X)/X)ENTRE XO Y X}

USES PRINTER,CRT;

CONST
  NMAX = 10;
  NDAT = 100;
  PRECISION = 1E-12;

TYPE
  REAL = EXTENDED;
  VECTORB = ARRAY[1..NMAX] OF BYTE;
  VECTORR = ARRAY[1..NMAX] OF REAL;
  MATRIZR = ARRAY[1..NMAX,1..NMAX + 1] OF REAL;
  FICHERO = STRING[12];
  VECTORDAT = ARRAY[1..NDAT] OF REAL;

VAR
  TIEMPO,N,M,I,E,FM,CM,F,C:BYTE;
  XII,DESVIACION,BMAX,A1,A2,A1M,FF,FA1,FA2:REAL;
  JB:VECTORB;
  B:MATRIZR;
  SOLUCION:VECTORR;
  NOMBRE_FICHERO:FICHERO;

```

DATOS:TEXT;

X,Y,YC,INT1:VECTORDAT;

CONT:CHAR;

PROCEDURE LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO:FICHERO;VAR M:BYTE;VAR X,Y:VECTORDAT);

BEGIN

 ASSIGN(DATOS,NOMBRE_FICHERO);

 RESET(DATOS);

 READLN(DATOS,M);

 FOR I:=1 TO M DO

 READLN(DATOS,X[I],Y[I]);

 CLOSE(DATOS);

END;

PROCEDURE INTEGRAL1

(VAR INT1:VECTORDAT);

{FUNCION SUBINTEGRAL: EXP(A[2]*X)/X}

VAR

IND1:BYTE;

IND2,IND3:WORD;

X0,XI,XV,DX,SUM,SUMA,SUMAI,INTU:REAL;

PRIMERO,CONTINT:BOOLEAN;

BEGIN

 X0:=Y[1];INT1[1]:=0;

 SUMAI:=EXP(A2*X0)/(2*X0);

 FOR IND1:=2 TO M DO

 BEGIN

 IND2:=10;CONTINT:=FALSE;PRIMERO:=TRUE;

 XI:=Y[IND1-1];

 SUMA:=SUMAI;

 REPEAT

 DX:=(Y[IND1]-XI)/IND2;

 FOR IND3:=1 TO IND2-1 DO

 BEGIN

 XV:=XI+DX*IND3;

```

SUMA:=SUMA+EXP(A2*XV)/XV;
END;
INTU:=EXP(A2*Y[IND1])/(2*Y[IND1]);
SUMA:=(SUMA+INTU)*DX;
IF PRIMERO THEN
BEGIN
SUM:=SUMA;IND2:=2*IND2;SUMA:=SUMAI;
PRIMERO:=FALSE;
END ELSE
IF (ABS((SUMA-SUM)/SUMA)<0.00001) THEN
BEGIN
INT1[IND1]:=INT1[IND1-1]+SUMA;
SUMAI:=INTU;CONTINT:=TRUE;
END ELSE
BEGIN
SUM:=SUMA;IND2:=2*IND2;SUMA:=SUMAI;
END
UNTIL CONTINT
END
END;

FUNCTION INTI(XII:REAL):REAL;
{FUNCION SUBINTEGRAL: EXP(A[2]*X)/X}
VAR
IND1:BYTE;
IND2,IND3:WORD;
X0,XV,DX,SUM,SUMA,SUMAI:REAL;
PRIMERO,CONTINT:BOOLEAN;
BEGIN
X0:=Y[1];INT1[1]:=0;IF (XII=X0) THEN INTI:=0 ELSE
BEGIN
SUMAI:=EXP(A2*X0)/(2*X0);SUMA:=SUMAI;
IND2:=10;CONTINT:=FALSE;PRIMERO:=TRUE;
REPEAT
DX:=(XII-X0)/IND2;
FOR IND3:=1 TO IND2-1 DO

```

```

BEGIN
  XV: = X0 + DX*IND3;
  SUMA: = SUMA + EXP(A2*XV)/XV;
END;
SUMA: = (SUMA + EXP(A2*XII)/(2*XII))*DX;
IF PRIMERO THEN
  BEGIN
    SUM: = SUMA;IND2: = 2*IND2;SUMA: = SUMAI;
    PRIMERO: = FALSE;
  END ELSE
  IF (ABS((SUMA-SUM)/SUMA) < 0.00001) THEN
    BEGIN
      INTI: = SUMA;
      CONTINT: = TRUE;
    END ELSE
    BEGIN
      SUM: = SUMA;IND2: = 2*IND2;SUMA: = SUMAI;
    END
  UNTIL CONTINT;
END
END;

PROCEDURE ITERACION_A
(TIEMPO:BYTE;VAR YC:VECTORDAT);
VAR
IND1:BYTE;
XIN,XSU,FIN,FSU,FIL,SRIN,SRSU,SRII:REAL;
CORRECTO:BOOLEAN;
BEGIN
  IF (TIEMPO < M) THEN BEGIN XIN: = Y[TIEMPO-1];XSU: = Y[TIEMPO + 1]; END
  ELSE BEGIN XIN: = Y[M-1];XSU: = Y[M]; END;
  FIN: = X[TIEMPO]-X[1]-INTI(XIN)/A1;SRIN: = SQR(FIN);
  FSU: = X[TIEMPO]-X[1]-INTI(XSU)/A1;SRSU: = SQR(FSU);
  CORRECTO: = FALSE;
  REPEAT
    XII: = XIN-((XIN-XSU)/(FIN-FSU))*FIN;

```



```

FII: = XII-X[1]-INTI(XII)/A1;SRII: = SQR(FII);
IF (SRII < 0.01) THEN CORRECTO: = TRUE ELSE
IF (FIN/FSU > 0)
THEN
IF (SRIN < SRSU) THEN BEGIN XSU: = XII;FSU: = FII END ELSE
BEGIN XIN: = XII;FIN: = FII; END
ELSE
IF (FSU/FII > 0) THEN BEGIN XSU: = XII;FSU: = FII END ELSE
BEGIN XIN: = XII;FIN: = FII; END
UNTIL CORRECTO;
YC[TIEMPO]: = XII
END;

```

```

PROCEDURE ITERACION_B
(TIEMPO:BYTE;VAR YC:VECTORDAT);
CONST
IMAX = 10;
VAR
IND1:BYTE;
XIN,FIN,FII,SRIN,SRII,DFIN:REAL;
BEGIN
XIN: = Y[TIEMPO];
FIN: = X[TIEMPO]-X[1]-INTI(XIN)/A1;SRIN: = SQR(FIN);
IND1: = 1;
REPEAT
DFIN: = EXP(A2*XIN)/(A1*XIN);
XII: = XIN-FIN/DFIN;
FII: = XII-X[1]-INTI(XII)/A1;SRII: = SQR(FII);
IND1: = IND1 + 1;
UNTIL (IND1 > IMAX);
YC[TIEMPO]: = XII
END;

```

```

PROCEDURE SUMATORIOS_RNL2(X,Y:VECTORDAT;M:BYTE;A1,A2:REAL;VAR B:MA-
TRIZR);
BEGIN

```

```

FOR F: = 1 TO 2 DO
FOR C: = F TO 3 DO
B[F,C]: = 0;
FOR I: = 2 TO M DO
BEGIN
  FF: = X[I]-X[1]-INT1[I]/A1;
  FA1: = INT1[I]/SQR(A1);
  FA2: = -(EXP(A2*Y[I])-EXP(A2*Y[1]))/(A1*A2);
  B[1,1]: = B[1,1] + SQR(FA1);
  B[1,2]: = B[1,2] + FA1*FA2;
  B[1,3]: = B[1,3] + FA1*FF;
  B[2,2]: = B[2,2] + SQR(FA2);
  B[2,3]: = B[2,3] + FA2*FF
END;
FOR F: = 2 TO 2 DO
FOR C: = 1 TO F-1 DO
B[F,C]: = B[C,F]
END;

```

```

PROCEDURE BUSCA_PIVOT_MAXIMO
(B:MATRIZR;N,E:BYTE;VAR FM,CM:BYTE;VAR BMAX:REAL);
BEGIN
  BMAX: = ABS(B[E,E]);FM: = E;CM: = E;
  FOR F: = E TO N DO
  FOR C: = E TO N DO
  BEGIN
    IF ABS(B[F,C]) > BMAX THEN
    BEGIN
      BMAX: = ABS(B[F,C]);FM: = F;CM: = C
    END
  END
END;

```

```

PROCEDURE CAMBIA_PIVOT_MAXIMO
(N,E,FM,CM:BYTE;VAR JB:VECTORB;VAR B:MATRIZR);
VAR

```

```

AUXX:BYTE;
AUXB:REAL;
BEGIN
  IF FM < > E THEN
    BEGIN
      FOR C: = E TO N+1 DO
        BEGIN
          AUXB: = B[E,C];B[E,C]: = B[FM,C];B[FM,C]: = AUXB
        END
      END;
    IF CM < > E THEN
      BEGIN
        AUXX: = JB[CM];JB[CM]: = JB[E];JB[E]: = AUXX;
        FOR F: = 1 TO N DO
          BEGIN
            AUXB: = B[F,E];B[F,E]: = B[F,CM];B[F,CM]: = AUXB
          END
        END
      END;
    END;

```

```

PROCEDURE REDUCCION_GAUSS_JORDAN

```

```

(N,E:BYTE;VAR B:MATRIZR);

```

```

VAR

```

```

DIVISOR,POR:REAL;

```

```

BEGIN

```

```

  DIVISOR: = B[E,E];

```

```

  FOR C: = E TO N+1 DO

```

```

    B[E,C]: = B[E,C]/DIVISOR;

```

```

  FOR F: = 1 TO N DO

```

```

    BEGIN

```

```

      IF F < > E THEN

```

```

        BEGIN

```

```

          POR: = B[F,E];

```

```

          FOR C: = E TO N+1 DO

```

```

            B[F,C]: = B[F,C]-B[E,C]*POR

```

```

        END

```

```
END
END;

PROCEDURE GAUSS_JORDAN(N:BYTE;VAR B:MATRIZR;VAR SOLUCION:VECTORR);
BEGIN
  FOR I:=1 TO N DO
    JB[I]:=I;
    FOR E:=1 TO N DO
      BEGIN
        BUSCA_PIVOT_MAXIMO(B,N,E,FM,CM,BMAX);
        IF (BMAX<PRECISION) THEN
          BEGIN
            WRITELN('SISTEMA INDETERMINADO');
            HALT;
          END;
        CAMBIA_PIVOT_MAXIMO(N,E,FM,CM,JB,B);
        REDUCCION_GAUSS_JORDAN(N,E,B);
      END;
    FOR I:=1 TO N DO
      SOLUCION[JB[I]]:=B[I,N+1];
    END;
END;

PROCEDURE RECALCULO_A1(X,Y,INT1:VECTORDAT;M:BYTE;A2:REAL;VAR A1M:REAL);
BEGIN
  A1M:=0;
  FOR I:=2 TO M DO
    A1M:=A1M+INT1[I]/(X[I]-X[1]);
    A1M:=A1M/(M-1)
  END;
END;

FUNCTION SSR(M:BYTE;X,Y,INT1:VECTORDAT;A1,A2:REAL):REAL;
VAR
  INDSSR:BYTE;
  SUMA:REAL;
BEGIN
  SUMA:=0;
```

```
FOR INDSSR: = 2 TO M DO
SUMA: = SUMA + SQR(X[INDSSR]-X[1]-INT1[INDSSR]/A1);
SSR: = SQRT(SUMA/(M-1));
END;

PROCEDURE COMP_IMPR;
BEGIN
  {$i-}WRITELN(LST);{$I+}
  IF NOT(IORESULT = 0) THEN
  BEGIN
    SOUND(1000);
    WRITELN('COMPRUEBE LA IMPRESORA');
    WRITELN('PULSE UNA TECLA PARA CONTINUAR');
    DELAY(400);
    NOSOUND;
    REPEAT UNTIL KEYPRESSED;
  END;
END;

BEGIN
  WRITE('REGRESION NO LINEAL (A) O RECALCULO (B): ');
  READLN(CONT);
  IF (CONT = 'A') THEN
  BEGIN
    WRITE('INTRODUCIR VALORES INICIALES a Y b: ');
    READLN(A1,A2);
    WRITE('INTRODUCIR NOMBRE DEL FICHERO DE DATOS: ');
    READLN(NOMBRE_FICHERO);
    LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO,M,X,Y);
    COMP_IMPR;
    INTEGRAL1(INT1);
    DESVIACION: = SSR(M,X,Y,INT1,A1,A2);
    WRITELN(LST,NOMBRE_FICHERO);
    WRITELN(LST,'VALORES INICIALES DE LOS PARAMETROS:');
    WRITELN(LST,' a = ',A1:8:4,' b = ',A2:8:4,' SSR = ',DESVIACION:10);
```

```

REPEAT
  SUMATORIOS_RNL2(X,Y,M,A1,A2,B);
  GAUSS_JORDAN(2,B,SOLUCION);
  A1: = A1-SOLUCION[1];
  A2: = A2-SOLUCION[2];
  INTEGRAL1(INT1);
  DESVIACION: = SSR(M,X,Y,INT1,A1,A2);
  WRITELN(LST,'NUEVOS VALORES DE LOS PARAMETROS:');
  WRITELN(LST,' a = ',A1:8:4,' b = ',A2:8:4,' SSR = ',DESVIACION:10);
  WRITELN('NUEVOS VALORES DE LOS PARAMETROS:');
  WRITELN(A1:12:6,A2:12:6,DESVIACION:15);
  WRITE('CONTINUAR (Y/N): ');
  READLN(CONT)
UNTIL (CONT = 'N');
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,'VALORES CALCULADOS CON LA ECUACION OBTENIDA:');
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,' t, min. ',' xexp ',' tcalc ');
WRITELN(LST,' -----',' -----',' -----');
INTEGRAL1(INT1);
FOR I: = 1 TO M DO
  BEGIN
    YC[I]: = X[1] + INT1[I]/A1;
    WRITELN(LST,X[I]:11:2,Y[I]:11:4,YC[I]:13:2)
  END
END;
IF (CONT = 'B') THEN
  BEGIN
    WRITE('INTRODUCIR VALOR DE b: ');
    READLN(A2);
    REPEAT
      WRITE('INTRODUCIR NOMBRE DEL FICHERO DE DATOS: ');
      READLN(NOMBRE_FICHERO);
      LEER_DATOS(NOMBRE_FICHERO,M,X,Y);
      INTEGRAL1(INT1);
      RECALCULO_A1(X,Y,INT1,M,A2,A1M);
    
```

```

WRITELN(LST);
WRITE('am = ',A1M:8:4);
WRITELN(LST,NOMBRE_FICHERO);
WRITELN(LST,'VALOR MEDIO DE a RECALCULADO:');
WRITELN(LST,' b = ',A2:8:4,' am = ',A1M:8:4);
WRITE('CONTINUAR (Y/N): ');
READLN(CONT)
UNTIL (CONT = 'N');
A1:= A1M;
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,'VALORES CALCULADOS CON LA ECUACION OBTENIDA:');
WRITELN(LST);
WRITELN(LST,' t, min. ' xexp ' xcalc ');
WRITELN(LST,' -----',' -----',' -----');
FOR I:=2 TO M DO
ITERACION_B(I,YC);
YC[1]= Y[1];
FOR I:= 1 TO M DO
WRITELN(LST,X[I]:11:2,Y[I]:11:4,YC[I]:11:4)
END
END.

```

9.4 VALORES RECALCULADOS

A continuación se indican las conversiones recalculadas de los experimentos realizados, salvo los que, a título de ejemplo, se encuentran en la parte 5 de esta Memoria.

Tabla 9.14
 Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 2.475 \text{ UA/L}$
 Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.58	0.0138	0.0130
4.75	0.0244	0.0290
7.58	0.0329	0.0385
9.95	0.0392	0.0446
13.25	0.0477	0.0515
17.83	0.0573	0.0591
20.25	0.0615	0.0624
22.25	0.0647	0.0649
24.66	0.0679	0.0677
27.50	0.0711	0.0706
30.50	0.0743	0.0735
35.50	0.0806	0.0777
42.00	0.0849	0.0824
50.75	0.0891	0.0878
58.00	0.0923	0.0917
66.40	0.0976	0.0956
77.50	0.1018	0.1001
88.66	0.1061	0.1040
103.33	0.1103	0.1085
116.00	0.1135	0.1119
125.50	0.1167	0.1143
140.50	0.1209	0.1176
152.93	0.1241	0.1201
169.50	0.1282	0.1232
192.00	0.1326	0.1269
240.00	0.1400	0.1336

Tabla 9.15

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 3.30$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	X_{exp}	X_{cal}
1.72	0.0211	0.0193
4.42	0.0341	0.0361
5.83	0.0423	0.0421
7.17	0.0455	0.0470
8.50	0.0488	0.0511
9.83	0.0536	0.0547
11.83	0.0585	0.0595
14.00	0.0634	0.0639
16.50	0.0683	0.0684
19.50	0.0715	0.0729
21.66	0.0764	0.0758
25.75	0.0829	0.0807
36.00	0.0910	0.0902
42.50	0.0975	0.0950
50.83	0.1008	0.1002
63.83	0.1073	0.1069
83.00	0.1154	0.1146
105.50	0.1219	0.1218
134.50	0.1284	0.1290
180.00	0.1382	0.1377

Tabla 9.16

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 81.16$ g/L $e_0 = 3.30$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.17	0.0108	0.0077
4.00	0.0154	0.0129
5.66	0.0185	0.0170
7.17	0.0216	0.0203
9.17	0.0246	0.0241
11.33	0.0285	0.0278
14.33	0.0323	0.0323
18.17	0.0362	0.0372
21.50	0.0393	0.0409
25.50	0.0439	0.0448
30.00	0.0470	0.0487
35.75	0.0524	0.0530
44.83	0.0570	0.0588
54.00	0.0616	0.0637
62.50	0.0662	0.0676
74.50	0.0708	0.0724
91.33	0.0762	0.0780
113.00	0.0808	0.0840
134.00	0.0862	0.0889
180.00	0.0939	0.0974

Tabla 9.17

Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L

T=50°C pH=8.0 $s_0=81.16$ g/L $e_0=4.95$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.50	0.0125	0.0119
3.57	0.0156	0.0159
4.75	0.0191	0.0197
6.08	0.0226	0.0235
7.25	0.0256	0.0265
8.92	0.0291	0.0303
10.42	0.0321	0.0334
12.17	0.0352	0.0366
13.83	0.0387	0.0394
15.66	0.0417	0.0422
18.50	0.0452	0.0460
20.00	0.0483	0.0479
22.33	0.0517	0.0506
24.66	0.0548	0.0530
27.66	0.0578	0.0559
31.17	0.0613	0.0590
35.17	0.0643	0.0622
40.00	0.0678	0.0656
45.17	0.0708	0.0689
52.58	0.0738	0.0730
59.92	0.0768	0.0767
70.66	0.0804	0.0813
80.83	0.0839	0.0851
92.75	0.0869	0.0890
104.83	0.0899	0.0926
120.00	0.0924	0.0965

Tabla 9.18
 Lactoalbúmina 75 L - Protease 660 L
 T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 128.91$ g/L $e_0 = 4.95$ UA/L
 Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
4.08	0.0095	0.0089
6.00	0.0120	0.0124
7.25	0.0143	0.0144
9.00	0.0168	0.0171
11.08	0.0193	0.0200
13.17	0.0218	0.0226
15.17	0.0243	0.0249
17.25	0.0266	0.0272
19.50	0.0291	0.0294
24.33	0.0332	0.0338
26.33	0.0355	0.0354
28.83	0.0373	0.0373
31.58	0.0393	0.0393
34.42	0.0411	0.0412
37.58	0.0433	0.0432
41.66	0.0453	0.0456
49.42	0.0500	0.0497
53.50	0.0519	0.0517
58.83	0.0538	0.0540
62.83	0.0560	0.0557
70.08	0.0576	0.0585
77.33	0.0601	0.0611
84.50	0.0620	0.0634
91.66	0.0643	0.0656
111.08	0.0680	0.0708
120.00	0.0702	0.0729

Tabla 9.19

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 1.59$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.62	0.0084	0.0080
2.17	0.0117	0.0104
3.60	0.0167	0.0159
4.75	0.0201	0.0198
6.00	0.0234	0.0237
7.42	0.0268	0.0277
9.75	0.0335	0.0334
12.33	0.0385	0.0389
15.17	0.0435	0.0441
18.50	0.0502	0.0495
24.00	0.0569	0.0569
29.66	0.0636	0.0633
35.17	0.0687	0.0687
42.42	0.0754	0.0747
50.25	0.0804	0.0803
64.00	0.0888	0.0885
84.00	0.0955	0.0980
107.83	0.1038	0.1068
131.50	0.1122	0.1140
180.00	0.1223	0.1254

Tabla 9.20
 Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L
 $T = 50^{\circ}\text{C}$ $\text{pH} = 8.0$ $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 3.18 \text{ UA/L}$
 Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	X_{exp}	X_{cal}
1.50	0.0134	0.0165
3.17	0.0268	0.0291
4.25	0.0335	0.0354
5.75	0.0402	0.0428
7.42	0.0469	0.0496
9.00	0.0536	0.0551
11.33	0.0603	0.0620
14.08	0.0687	0.0688
17.58	0.0770	0.0760
20.67	0.0821	0.0814
26.50	0.0904	0.0898
34.00	0.1005	0.0985
41.92	0.1089	0.1060
58.42	0.1189	0.1179
73.00	0.1290	0.1261
94.83	0.1373	0.1357
120.00	0.1474	0.1445
155.17	0.1574	0.1541
180.00	0.1658	0.1596

Tabla 9.21

Lactoalbúmina 75 L - Alcalasa 0.6 L

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 18.73$ g/L $e_0 = 3.18$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.73	0.0387	0.0463
3.57	0.0490	0.0538
5.00	0.0593	0.0638
6.13	0.0662	0.0702
8.25	0.0799	0.0800
10.25	0.0868	0.0873
13.17	0.0971	0.0960
18.42	0.1109	0.1078
22.42	0.1177	0.1149
30.75	0.1281	0.1264
41.75	0.1418	0.1377
61.92	0.1521	0.1523
87.25	0.1659	0.1652
109.83	0.1762	0.1738
150.17	0.1899	0.1856
180.00	0.1968	0.1925

Tabla 9.22

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45 \text{ g/L}$ $e_0 = 1.58 \text{ UA/L}$

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.58	0.0067	0.0055
3.33	0.0100	0.0103
5.33	0.0134	0.0146
9.50	0.0184	0.0215
13.03	0.0234	0.0259
16.63	0.0267	0.0296
21.25	0.0300	0.0336
25.50	0.0334	0.0366
31.33	0.0384	0.0402
38.50	0.0418	0.0439
52.00	0.0485	0.0494
64.00	0.0535	0.0533
80.50	0.0585	0.0576
101.82	0.0652	0.0622
131.67	0.0719	0.0672
166.50	0.0769	0.0719
180.00	0.0785	0.0734

Tabla 9.23

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 3.94$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.07	0.0083	0.0096
1.87	0.0134	0.0147
2.60	0.0167	0.0184
3.88	0.0217	0.0237
5.00	0.0250	0.0274
6.17	0.0284	0.0306
7.67	0.0334	0.0341
9.33	0.0367	0.0375
11.33	0.0401	0.0408
13.58	0.0451	0.0441
17.75	0.0501	0.0490
23.00	0.0551	0.0539
29.33	0.0618	0.0585
38.25	0.0668	0.0637
50.25	0.0735	0.0690
71.17	0.0785	0.0759
104.33	0.0852	0.0836
144.50	0.0902	0.0902
180.00	0.0935	0.0946

Tabla 9.24

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T=50°C pH=8.0 $s_0=38.45$ g/L $e_0=8.06$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.02	0.0250	0.0286
3.30	0.0350	0.0366
4.50	0.0400	0.0420
6.00	0.0467	0.0472
7.75	0.0517	0.0519
10.17	0.0583	0.0571
13.60	0.0633	0.0627
17.17	0.0683	0.0673
23.50	0.0750	0.0735
31.67	0.0817	0.0795
44.00	0.0867	0.0861
59.67	0.0917	0.0922
77.33	0.0984	0.0975
104.83	0.1034	0.1037
136.25	0.1100	0.1090
180.00	0.1150	0.1147

Tabla 9.25

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 10.50$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	X_{exp}	X_{cal}
1.95	0.0300	0.0334
2.42	0.0333	0.0370
3.00	0.0367	0.0407
3.83	0.0433	0.0451
4.67	0.0467	0.0487
5.50	0.0500	0.0518
6.83	0.0567	0.0559
8.25	0.0600	0.0595
10.08	0.0650	0.0634
13.17	0.0717	0.0687
17.37	0.0767	0.0742
22.17	0.0833	0.0790
30.33	0.0884	0.0853
42.83	0.0950	0.0923
61.00	0.1000	0.0995
91.00	0.1067	0.1076
134.33	0.1150	0.1155
180.00	0.1200	0.1215

Tabla 9.26

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 18.73$ g/L $e_0 = 8.06$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.14]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.17	0.0344	0.0330
2.67	0.0482	0.0474
4.42	0.0619	0.0569
6.67	0.0688	0.0649
9.25	0.0756	0.0714
15.50	0.0859	0.0817
26.92	0.0928	0.0928
49.00	0.1031	0.1050
89.00	0.1100	0.1171
158.42	0.1203	0.1289
200.00	0.1237	0.1336

Tabla 9.27

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 1.58$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.30]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.58	0.0067	0.0067
3.33	0.0100	0.0111
5.33	0.0134	0.0151
9.50	0.0184	0.0189
13.03	0.0234	0.0240
16.63	0.0267	0.0261
21.25	0.0300	0.0276
25.50	0.0334	0.0304
31.33	0.0384	0.0360
38.50	0.0418	0.0381
52.00	0.0485	0.0449
64.00	0.0535	0.0505
80.50	0.0585	0.0556
101.82	0.0652	0.0643
131.67	0.0719	0.0725
166.50	0.0769	0.0778
180.00	0.0785	0.0794

Tabla 9.28

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 3.94$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.30]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.07	0.0083	0.0083
1.87	0.0134	0.0153
2.60	0.0167	0.0187
3.88	0.0217	0.0232
5.00	0.0250	0.0254
6.17	0.0284	0.0282
7.67	0.0334	0.0336
9.33	0.0367	0.0359
11.33	0.0401	0.0384
13.58	0.0451	0.0444
17.75	0.0501	0.0485
23.00	0.0551	0.0528
29.33	0.0618	0.0611
38.25	0.0668	0.0656
50.25	0.0735	0.0735
71.17	0.0785	0.0766
104.33	0.0852	0.0826
144.50	0.0902	0.0863
180.00	0.0935	0.0887

Tabla 9.29

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 8.06$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.30]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
2.02	0.0250	0.0250
3.30	0.0350	0.0356
4.50	0.0400	0.0391
6.00	0.0467	0.0463
7.75	0.0517	0.0508
10.17	0.0583	0.0583
13.60	0.0633	0.0622
17.17	0.0683	0.0675
23.50	0.0750	0.0746
31.67	0.0817	0.0822
44.00	0.0867	0.0860
59.67	0.0917	0.0903
77.33	0.0984	0.0990
104.83	0.1034	0.1035
136.25	0.1100	0.1119
180.00	0.1150	0.1170

Tabla 9.30

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 38.45$ g/L $e_0 = 10.50$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.30]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.95	0.0300	0.0300
2.42	0.0333	0.0322
3.00	0.0367	0.0344
3.83	0.0433	0.0425
4.67	0.0467	0.0449
5.50	0.0500	0.0480
6.83	0.0567	0.0569
8.25	0.0600	0.0595
10.08	0.0650	0.0653
13.17	0.0717	0.0732
17.37	0.0767	0.0778
22.17	0.0833	0.0860
30.33	0.0884	0.0904
42.83	0.0950	0.0971
61.00	0.1000	0.1007
91.00	0.1067	0.1070
134.33	0.1150	0.1166
180.00	0.1200	0.1215

Tabla 9.31

Lactoalbúmina 75 L - P.E.M. 2500 S

T = 50°C pH = 8.0 $s_0 = 18.73$ g/L $e_0 = 8.06$ UA/L

Valores calculados con la ecuación [5.30]

t, min	x_{exp}	x_{cal}
1.17	0.0344	0.0344
2.67	0.0482	0.0474
4.42	0.0619	0.0649
6.67	0.0688	0.0708
9.25	0.0756	0.0781
15.50	0.0859	0.0888
26.92	0.0928	0.0927
49.00	0.1031	0.1025
89.00	0.1100	0.1053
158.42	0.1203	0.1160
200.00	0.1237	0.1187