



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO Y MODELAJE MATEMÁTICO DE LA OBTENCIÓN
DE PÉPTIDOS A PARTIR DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE
PROTEÍNAS”

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

I.B.Q. GABRIELA MARTÍNEZ ARAIZA

DIRIGIDO POR

Dr. EDUARDO CASTAÑO TOSTADO

C.U. SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO., NOVIEMBRE DE 2010



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“ESTUDIO Y MODELAJE MATEMÁTICO DE LA OBTENCIÓN DE
PÉPTIDOS A PARTIR DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.B.Q. Gabriela Martínez Araiza

Dirigido por:

Dr. Eduardo Castaño Tostado

SINODALES

Dr. Eduardo Castaño Tostado
Presidente



Firma

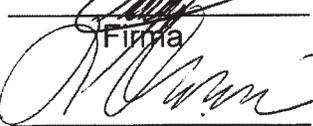
Dra. Silvia L. Amaya Llano
Secretario

RUBRICA



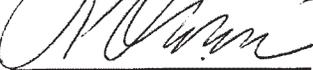
Firma

Dra. Rosalía Reynoso Camacho
Vocal



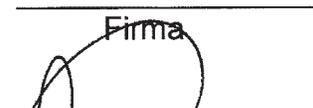
Firma

Dr. Lech Ozimek
Suplente

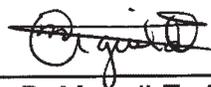


Firma

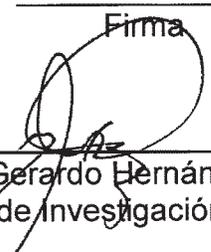
M.en I. Carlos Martínez Vera
Suplente



Firma



Q. B. Magali E. Aguilar Ortiz
Director de la Facultad



Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre, 2010
México

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecerle a Dios, porque me iluminó en todos los momentos en que más necesitaba de su ayuda.

A mis papás, Francisco y María, por todo su apoyo a lo largo de este tiempo, agradezco la confianza que tienen en mí, también les doy gracias por todos sus consejos, ya que me ayudaron a salir adelante cada vez que creía que no iba a poder seguir, este trabajo está dedicado a ustedes, son los mejores padres del mundo y los quiero muchísimo.

Al Dr. Eduardo Castaño porque siempre me apoyó y encontró los medios para que el proyecto pudiera seguir a pesar de las dificultades que se presentaran, además gracias por todos los consejos y conocimientos que me dio a lo largo de este tiempo.

A la Dra. Rosalía Reynoso por el apoyo incondicional que me brindó durante mi proyecto de tesis incluyendo todos los consejos que me dio durante todo este tiempo, así como a Yuli que incondicionalmente con ayuda de la Dra. Rosalía me apoyaron en la elaboración de este proyecto.

A mi novio Christian, que siempre estuvo a mi lado apoyándome en todos los buenos y malos momentos, gracias por hacerme reír cuando no veía solución a las cosas y estaba de mal humor, eres un gran apoyo en mi vida y una gran persona, te quiero muchísimo mi amor.

A mis compañeros de laboratorio Luis, gracias por todo tu apoyo y disponibilidad que siempre tuviste y sigues teniendo conmigo, principalmente muchas gracias por ayudarme con mis tramites que se que no te fueron sencillos, Maricarmen, gracias por tu paciencia y conocimiento compartido, Carlos y Miguel, gracias por siempre hacer que las largas horas del laboratorio se hicieran más cortas con sus comentarios y buenos momentos compartidos, sobre todo a costa de Santi, Vanessa, gracias por ayudarme con tus conocimientos cuando más te necesitaba, Victor, gracias por tus comentarios y por presentarme a Simón, y sobre todo gracias a todos por su amistad.

A mis compañeros de casa, Ana Laura, gracias por hacer más fácil la maestría con tu apoyo y por los momentos buenos y malos que compartimos en casita, Adriana, gracias porque siempre lograbas distraerme y hacerme reír cuando era necesario y por molestar y bañar a mi gato Santi, las quiero mucho a las dos y sobre todo gracias por su amistad.

A mis mejores amigas Mago, Maguito, Ale y Susy gracias por todos los momentos geniales que hemos pasado y gracias por su paciencia para seguir estando ahí a pesar de todas las veces que tuve que cancelar debido a la maestría nuestras reuniones, las quiero mucho amigas.

Y gracias a todos los que hicieron posible esta tesis, a los que me aportaron su ayuda, conocimiento y tiempo, fueron un gran apoyo y gracias a eso: ¡por fin hemos terminado!

Gabriela Martínez Araiza

RESUMEN

Los hidrolizados de proteínas pueden ser adicionados para mejorar las propiedades funcionales, nutricionales e inmunológicas del alimento original. Con el objeto de estudiar los grados de hidrólisis obtenidos de los concentrados de proteína de frijol Pinto Durango y de suero de leche utilizando una enzima alcalasa, se utilizó un biorreactor tipo lote (BTL) y uno de tipo membrana (BTM).

Para la hidrólisis del suero de leche se compararon tratamientos consistentes en diferentes concentraciones iniciales de enzima y sustrato, así como también el uso o no de un precalentamiento a 85 °C por 15 min., fijos pH y temperatura de 8 y 50°C respectivamente, cada tratamiento se monitoreó 180 minutos. Se ajustaron las curvas de grados de hidrólisis de cada tratamiento a modelos exponenciales mediante técnicas de regresión no lineal; las correspondientes constantes cinéticas fueron estimadas. No se identificó ninguna relación con el modelo de Michaelis-Menten. El mecanismo de reacción, incluyendo un patrón de no inhibición debido al sustrato o al producto fue elucidado; una reacción de segundo orden con una inactivación enzimática fue confirmada.

Para el frijol Pinto Durango se compararon tratamientos en BTL que consistían en el uso o no de precalentamiento y en BTM también la recirculación (180 minutos) o no recirculación (45 minutos), fijos pH en 8 y temperatura en 50°C. La hidrólisis se incrementó con el precalentamiento, obteniéndose casi el doble de hidrolizados comparado con los que no fueron precalentados. Se aprecia también que los hidrolizados obtenidos por BTM sin recirculación y con precalentamiento, son equiparables a BTL en los primeros 45 min. Se verificó la hidrólisis observando el perfil de los péptidos mediante una electroforesis unidimensional; se evaluó su capacidad antioxidante mediante un ensayo ABTS. En los hidrolizados del BTM se observó que los péptidos muestran menor capacidad antioxidante comparado con los obtenidos en BTL.

(Palabras claves: Suero de leche, frijol, precalentamiento)

SUMMARY

Protein hydrolysis products can be used to improve functional, nutritional and immunological properties of food. A stirred batch reactor (BR) and a membrane reactor (MR) were used to study the hydrolysis degree of Pinto Durango bean's protein concentrate and whey protein concentrate using alcalase as the enzyme for the reaction.

Different treatments, consisting of different initial concentrations of enzyme as well as the presence or not of a preheating treatment at 85 ° C for 15 min, were tested for whey protein hydrolysis. All treatments were carried out at pH 8 and 50 ° C and each treatment was monitored during 180 minutes. The resulting curves of hydrolysis degree were adjusted for each treatment to exponential models using nonlinear regression techniques; the corresponding kinetics constants were estimated. A non Michaelis - Menten relationship was identified. The reaction mechanism, including a non inhibitory pattern due to substrate or product was elucidated; second order enzyme inactivation, was confirmed.

In the case of the Pinto Durango beans, treatments in BR including or not preheating treatment and MB recirculation (180 minutes) or not recirculation (45 minutes) were compared; all treatments were set at pH 8 and 50 ° C. The hydrolysis degree was increased by the preheating treatment, resulting in almost hydrolysis products compared to those which were not preheated. It was also observed that the hydrolysates obtained by MB without recirculation in presence of the preheating treatment, were comparable to the BR-treated during the first 45 min. The hydrolysis degree was verified by observing the peptides profile using a one-dimensional electrophoresis technique; the antioxidant activity of hydrolysates was assessed by ABTS assay. MB-hydrolysates showed peptides with lower antioxidant capacity compared with those obtained by BR.

(Keywords: whey protein concentrate, beans, preheating treatment)

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	I
SUMMARY	II
ÍNDICE GENERAL	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE CUADROS	I
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 FRIJOL COMÚN	4
2.2 SUERO DE LECHE	5
2.2.1 <i>β-lactoglobulina</i>	6
2.2.2 <i>α-lactoalbúmina</i>	6
2.3 PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS	6
2.3.1 <i>Péptidos bioactivos</i>	7
2.3.2 <i>Origen de los péptidos bioactivos</i>	8
2.3.3 <i>Capacidad Antioxidante</i>	9
2.3.4 <i>Ensayo del Ácido 3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)</i>	9
2.3.5 <i>Electroforésis</i>	10
2.4 ENZIMA	10
2.5 PROTEÓLISIS	12
2.6 HIDROLIZADOS DE PROTEÍNAS	14
2.7 MEDIDA DEL GRADO DE HIDRÓLISIS.....	16
2.8 DEFINICIÓN DE BIORREACTOR	17
2.9 TIPOS DE REACTORES PARA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS.....	18
2.9.1 <i>Reactor tipo Lote</i>	18
2.9.2 <i>Reactores de membrana</i>	19
2.9.3 <i>Biorreactor de Membrana de placa</i>	20
2.10 DEFINICIÓN DE MEMBRANA.....	23
2.11 FILTRACIÓN	24
2.12 FENÓMENOS DE POLARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y COLMATAJE.....	26
2.13 PROCESOS DE SEPARACIÓN POR MEMBRANAS.....	27
2.13.1 <i>Osmosis Inversa (RO por sus siglas en inglés)</i>	28
2.13.2 <i>Nanofiltración (NF por sus siglas en inglés)</i>	29
2.13.3 <i>Micro filtración (MF)</i>	29

2.13.4 <i>Diafiltración (DF)</i>	29
2.13.5 <i>Ultrafiltración</i>	30
2.14 MODELO MATEMÁTICO.....	31
2.15 OPTIMIZACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA.....	33
3. JUSTIFICACIÓN.....	36
4. OBJETIVO GENERAL.....	37
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5. METODOLOGÍA.....	38
5.1 ENZIMA Y SUSTRATO (SUERO DE LECHE).....	38
5.2 ENZIMA Y SUSTRATO (CONCENTRADOS DE FRIJOL).....	38
5.3 PREPARACIÓN DE LOS HIDROLIZADOS.....	39
5.3.1 <i>Con Suero de leche</i>	39
5.3.2 <i>Con Frijol</i>	39
5.5 OBTENCIÓN DE LOS HIDROLIZADOS.....	40
5.5.1 <i>En biorreactor tipo Lote para suero de leche</i>	40
5.5.2 <i>Biorreactor tipo Lote para Frijol</i>	40
5.5.3 <i>Biorreactor de membrana para frijol</i>	41
5.6 GRADO DE HIDROLISIS.....	42
5.6.1 <i>pH-estado</i>	42
5.6.2 <i>Método de OPA</i>	44
5.7 CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	47
5.7.1 <i>Método de Lowry</i>	47
5.8 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO POR EL MÉTODO DE LAEMMLI.....	48
5.9 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO POR EL MÉTODO DE TRIS-TRISINA.....	49
5.10 ANTIOXIDANTES.....	49
5.11 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	50
6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	52
6.1 MODELAJE DEL GRADO DE HIDRÓLISIS DEL SUERO DE LECHE POR REGRESIÓN NO LINEAL.....	52
6.2 GRADO DE HIDRÓLISIS EN FRIJOL PINTO DURANGO.....	61
6.2.1 <i>Grado de hidrólisis en biorreactor tipo lote</i>	61
6.2.2 <i>Grado de hidrólisis en biorreactor tipo membrana</i>	62
6.3 MODELAJE DEL GRADO DE HIDRÓLISIS DE CONCENTRADO DE PROTEÍNAS DE FRIJOL PINTO DURANGO.....	68
6.4 IDENTIFICACIÓN DEL PERFIL DE LOS PÉPTIDOS MEDIANTE UN ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO UNIDIMENSIONAL DE FRIJOL PINTO DURANGO.....	70
6.4.1 <i>En biorreactor tipo lote</i>	70
6.4.2 <i>En biorreactor de membrana</i>	71

6.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	73
6.5.1 Comparación de efectos sobre la capacidad antioxidante de las condiciones y del tiempo de hidrólisis	75
7. CONCLUSIONES	77
8. BIBLIOGRAFÍA	81
9. ANEXOS	86
9.1 Limpieza del biorreactor	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
2.1 Dos aminoácidos formando un péptido	7
2.2 SEPA CF II Elementos de la membrana de la celda	23
2.3 Filtración convencional	25
2.4 Filtración tangencial de flujo de membrana.....	25
2.5. Espectro de aplicaciones de procesos de separación por membrana con filtración de flujo tangencial.....	28
2.6 Clasificación de los procesos de membrana	31
5.1 Esquema general con los puntos clave de medición.	51
6.1 Efectos de E_0/S_0 en las curvas de grados de hidrólisis de suero de leche con y sin precalentamiento, a 3 concentraciones de enzima y sustrato diferentes	53
6.2 Relación entre \hat{a} y E_0/S_0	55
6.3 Relación entre b y S_0	56
6.4 Relación entre $1/a$ y $1/S_0$	59
6.5 Relación entre E_0t y el grado de hidrólisis	60
6.6 Grado de hidrólisis de la proteína de frijol utilizando dos concentraciones de enzima inicial a) 18.36 AU/L y b) 13.77 AU/L, con y sin precalentamiento, método pH estado.....	61
6.7 Gráficas para comparar grados de hidrólisis, pH estado versus OPA con y sin calentamiento en un biorreactor tipo lote en hidrolizados de frijol común de la variedad Pinto Durango	63
6.8 Diagrama de la recirculación en el biorreactor de membrana	64
6.9 Comparación de grado de hidrólisis por lote y por operación continua, considerando efectos de precalentamiento y de recirculación sobre la proteína de frijol común de la variedad Pinto Durango, en donde en a) es la hidrólisis en biorreactor tipo lote y en b) hidrólisis por operación continua con recirculación y c) hidrólisis por operación continua sin recirculación	66
6.10 Análisis electroforético SDS-Page con y sin precalentamiento de proteínas y péptidos de frijol Pinto Durango en biorreactor tipo lote	70
6.11 Análisis electroforético SDS-Page de proteínas y péptidos de frijol Pinto Durango en biorreactor de membrana con recirculación con precalentamiento (a) y sin precalentamiento (b), y sin recirculación con precalentamiento (c) y sin precalentamiento (d)	72
6.13 Porcentaje de inhibición del radical ABTS por péptidos de proteínas de frijol en biorreactor tipo lote (a) y tipo membrana sin (b) y con (c) recirculación.....	74
6.14 Actividad antioxidante de los péptidos de frijol producidos a diferentes tiempos y condiciones de hidrólisis.....	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
5.1	Grado de disociación para proteínas en función de la temperatura y el pH 44
6.1	Parámetros a y b estimados (error estándar) por regresión no lineal para las diferentes condiciones de hidrólisis 54
6.2	Valores de las constantes cinéticas estimadas para hidrólisis de proteínas de suero de leche usando alcalasa 58
6.3	Parámetros a y b estimados por regresión no lineal para las diferentes condiciones 68

1. INTRODUCCIÓN

El suero de leche es un subproducto de la manufactura de quesos, caseína, caseinatos y mantequilla, que representa del 80 al 90 por ciento del volumen del lácteo transformado por la industria lechera. La fracción de proteína en el suero de la leche es aproximadamente un 10% del peso y comprende cuatro principales tipos de proteínas. El suero producido en México contiene aproximadamente 50 mil toneladas de lactosa potencialmente transformable y 9 mil toneladas de proteína potencialmente recuperable.

El frijol es una buena fuente de carbohidratos, proteínas, fibra dietética, (principalmente fibra insoluble), vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, ácido fólico) y en menor medida, de algunos minerales como el calcio, hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio, mientras que la cáscara contiene flavonoides que actúan como antioxidantes (Morales de León *et al.*, 2007).

Los hidrolizados de proteínas se emplean a escala comercial en productos hipoalergénicos y en nutrición clínica debido, entre otras cosas, a la reducción de antigenicidad de la proteína conseguida mediante la hidrólisis enzimática. Actualmente, los hidrolizados enzimáticos de proteínas se producen en operaciones por lotes en reactores tipo tanque agitado. Sin embargo; este modo de operación conlleva inconvenientes importantes: infrautilización de enzima, costo energético asociado a la desactivación térmica de la enzima, costo de mano de obra, variabilidad lote a lote, etc.

Para superar estos inconvenientes se han empleado reactores con enzimas inmovilizadas y reactores continuos de membrana. Sin embargo; hasta la fecha su aplicación industrial es muy limitada debido por una parte al alto costo asociado a la inmovilización y por otra a los fenómenos de colmatación de las membranas que limitan su operatividad (Prieto Velazco, 2007).

Los procesos con reactores de membrana constituyen una serie de técnicas de separación que consisten en emplear un gradiente, ya sea de presión o

electrostático, para forzar el paso de componentes de una disolución a través de una membrana porosa semipermeable, para que se obtenga una separación sobre la base del tamaño, e incluso de la carga molecular (Chacón-Villalobos, 2006).

La presión requerida para forzar el paso a través de alguna membrana suele ser proporcional al tamaño de los poros, siendo necesario incrementar sustancialmente su magnitud a medida que el tamaño de éstos decrece. Entre ambos lados de la membrana se establece un diferencial de presión denominado “presión transmembranaria” y que es utilizado como un parámetro importante asociado al rendimiento del proceso de membranas. La permeabilidad de una membrana es adecuada cuando se registra una relación lineal entre un flujo de agua de baja dureza y la presión transmembranaria que se registra de la misma. Este rendimiento de la membrana en términos de la cantidad de permeado obtenido, no sólo depende de esta presión transmembranaria, sino también de la velocidad del flujo de alimentación, la temperatura, la concentración del fluido y las características fisicoquímicas de la membrana (Chacón-Villalobos, 2006).

Actualmente los diseños de productos y procesos necesitan ser flexibles. El método por prueba y error ya no es la mejor manera para alcanzar la calidad, una forma más sistemática es por medio del diseño experimental y el correspondiente modelado matemático. Se puede realizar un diseño del proceso, como una simulación en un laboratorio virtual utilizando modelos cuantitativos. El modelado se puede utilizar en diferentes niveles. Algunos tipos de modelado que son importantes en el diseño de alimentos son los modelos de superficie de respuesta, modelos cinéticos así como algunas herramientas estadísticas multivariadas (Van Boekel, 2008).

Actualmente no existe ningún trabajo de optimización usando un biorreactor de placas por ultrafiltración *para* hidrolizado de proteínas; además, la optimización de este proceso podría derivar en una mayor producción de hidrolizados, que se traduciría en una reducción de costos y en volver más competitivos los procesos actuales de producción de hidrolizados. Además, la realización de un modelo matemático ayuda a conocer más a fondo el fenómeno y a estar en posibilidad de

proponer innovaciones, ya que este conjunto de ecuaciones, al usar los parámetros adecuados, permite realizar simulaciones. Por otro lado ofrece la ventaja de que el modelo matemático puede ser usado para proponer mejoras en la operación o el diseño de un mecanismo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Frijol común

El frijol común, junto con el maíz, constituye el alimento básico de la dieta en la mayoría de los mexicanos y se ha utilizado en la preparación de platos tradicionales y las comidas durante muchos años (Morales de León *et al.*, 2007).

En el ámbito mundial, México se encuentra entre los cinco principales productores de frijol conjuntamente con la India, Brasil, China y los Estados Unidos de América, países que en total aportan el 63% de la producción mundial. México contribuye con el 7% en promedio de las cosechas mundiales (Paredes López *et al.*, 2006).

Los frijoles son una buena fuente de carbohidratos, proteínas, fibra dietética, principalmente fibra insoluble, vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, ácido fólico) y en menor medida, de algunos minerales como el calcio, hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio, mientras que la cáscara contiene flavonoides que actúan como antioxidantes (Morales de León *et al.*, 2007).

El porcentaje de proteínas en cultivos de frijol común comercial presenta un intervalo de valores de 14 a 33%. La variación del porcentaje de proteínas no solo depende de los genes que controlan la síntesis y acumulación de proteínas específicas, sino también de genes que controlan otros factores, tales como la adquisición de nutrientes, maduración, producción y tamaño de la semilla, y la síntesis y acumulación de almidón y de otros compuestos en la misma semilla. Además, también los factores ambientales, tales como la localización geográfica y el tiempo de cosecha, pueden influir en el contenido de proteínas en el frijol (Paredes López *et al.*, 2006).

Los principales componentes de las proteínas de frijol son las globulinas (81%) y albuminas (31%). En contraste con otras leguminosas, el frijol común contiene altos niveles de glutelina (7-15 % vs. 20-30 %, respectivamente). Además, dentro la globulinas la faseolina representa del 40-50% del total de las

proteínas contenidas en el frijol y existen más de 40 diferentes tipos de faseolina que han sido clasificados por medio de un análisis electroforético. Los pesos moleculares del rango de subunidades de la faseolina se encuentran entre los 43 a 53 kDa (Montoya *et al.*, 2008; Montoya *et al.*, 2010; Yeboah F. K *et al.*, 1999).

Estudios clínicos han mostrado que el consumo regular de frijoles contribuye a disminuir la incidencia de cáncer de colon y su multiplicación, alteraciones en el tracto gastrointestinal, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Morales de León *et al.*, 2007).

Según Muñoz de Chávez, (1999) encontró que el frijol promedio contiene 19.20 g de proteínas por cada 100 g de alimento crudo en peso neto, mientras que el frijol negro *Phaseolus vulgaris* L. contiene 21.80 g por cada 100 g de alimento crudo en peso neto. Siendo de las leguminosas que contienen la mayor cantidad de proteínas por cada 100 g de alimento crudo en peso neto, logrando que se pueda hacer el comparativo con el contenido de proteínas de carnes y vísceras así como el de algunos tipos de leche.

Los frijoles contienen varios factores antinutricionales como los inhibidores de tripsina, quimotripsina, y la amilasa, que interfieren con la biodisponibilidad de nutrientes; los frijoles también contienen ácido fítico, oligosacáridos que producen flatulencia, saponinas y lectinas, que interfieren con la biodisponibilidad de hierro (Morales de León *et al.*, 2007).

2.2 Suero de Leche

El suero de leche, es un subproducto de la manufactura de quesos, caseína, caseinatos y mantequilla, que representa del 80 al 90 por ciento del volumen del lácteo transformado por la industria lechera.

La fracción de proteína en el suero de la leche es aproximadamente un 10% del peso y comprende cuatro principales tipos de proteínas. El mayor contenido es de β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, seroalbúmina e inmunoglobulina.

La producción mundial anual estimada de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de

lactosa. El suero producido en México contiene aproximadamente 50 mil toneladas de lactosa potencialmente transformable y 9 mil toneladas de proteína potencialmente recuperable. A pesar de los múltiples usos del suero, 47 por ciento es descargado en suelo, drenajes y cuerpos de agua, tornándose en un serio problema para el ambiente (Carrillo Aguado, 2006).

2.2.1 β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina es la proteína más común en la leche de vaca, representa aproximadamente el 50 % de las proteínas totales del suero de leche y cerca del 12 % de las proteínas totales en la leche.

La β -lactoglobulina tiene una estructura compacta globular, en donde cada monómero existente casi parece una esfera de aproximadamente 3.6 nm de diámetro, su estructura terciaria es conocida (Fox & McSweeney, 2003).

2.2.2 α -lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina representa aproximadamente el 20 % de las proteínas presentes en el suero de leche bovino, que es aproximadamente el 3.5 % de las proteínas totales contenidas en la leche y es la principal proteína en la leche humana. Es una pequeña proteína de un peso aproximado de 14 kDa y su molécula ha sido bien caracterizada (Fox & McSweeney, 2003).

2.3 Proteínas y péptidos

Las proteínas son organismos complejos de alto peso molecular, formados por largas cadenas de pequeñas unidades llamadas aminoácidos, estas unidades están ligadas por enlaces peptídicos. Una cadena de péptidos está formado por un enlace covalente entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de el siguiente aminoácidos. Este proceso se muestra en la Fig. 2.1.

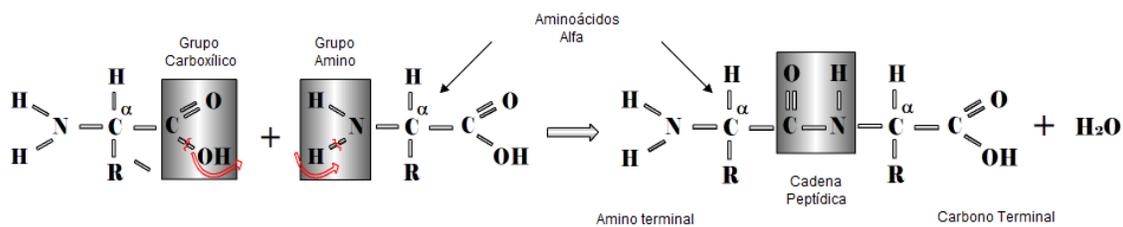


Fig. 2.1 Dos aminoácidos formando un péptido.

Adaptado de Barona, 2007.

Una macromolécula de proteína consiste de una o más cadenas de aminoácidos ligados, donde los aminoácidos están acomodados en un orden específico. Una molécula de proteína usualmente contiene alrededor de 100-200 aminoácidos unidos.

La unión de un bajo número de aminoácidos da lugar a un péptido:

- Oligopéptido: Número de aminoácidos = menos de 10.
- Polipéptido : Número de aminoácidos = más de 10.
- Proteína: Número de aminoácidos = más de 100. Las proteínas con una sola cadena polipeptídica se denominan proteínas monoméricas, mientras que las compuestas de más de una cadena polipeptídica se conocen como proteínas multiméricas.

Los péptidos se diferencian de las proteínas en que son más pequeños (tienen menos de diez mil o doce mil Daltons) y que las proteínas pueden estar formadas por la unión de varios polipéptidos y a veces grupos prostéticos (Barona, 2007).

2.3.1 Péptidos bioactivos

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo y mantenimiento de células y tejidos de nuestro organismo. Como

consecuencia de la digestión de las proteínas, además de aminoácidos libres, se liberan péptidos, que son cadenas con distintos números de aminoácidos. En los últimos años existe un creciente interés por determinados fragmentos específicos de las proteínas de la dieta que tienen una actividad biológica, regulando procesos fisiológicos, además de su valor nutricional.

La literatura científica evidencia que estos péptidos bioactivos pueden atravesar el epitelio intestinal y llegar a tejidos periféricos vía circulación sistémica, pudiendo ejercer funciones específicas a nivel local, tracto gastrointestinal, y a nivel sistémico. Dentro de estas actividades, los péptidos bioactivos podrían alterar el metabolismo celular y actuar como vasoreguladores, factores de crecimiento, inductores hormonales y neurotransmisores (Baró L. *et al.*, 2001).

2.3.2 Origen de los péptidos bioactivos

Toda fuente de proteína alimentaria es susceptible de aportar péptidos funcionales, de forma que aparte de la leche humana y de vaca, donde han sido más estudiados, se han aislado péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos de proteínas muy diversas: sardina, maíz, soya, gelatina, etc.

Hoy en día, existen diferentes fórmulas nutricionales que contienen péptidos, pero el tipo y cantidad de los mismos varía de unas a otras dependiendo de la fuente proteica utilizada (caseína, lactoalbúmina, soya, carne) y del grado y tipo de hidrólisis enzimática empleada. Prueba de la importancia de estos péptidos son los distintos efectos fisiológicos obtenidos variando la fuente proteica. Así se han obtenido mejores respuestas inmunológicas en ratones alimentados con hidrolizados de lactoalbúmina que de caseína, mejor respuesta inmune con caseína que con proteína de legumbres, menor presión arterial en individuos alimentados con proteína vegetal respecto animal (Baró L. *et al.*, 2001)..

2.3.3 Capacidad Antioxidante

El consumo de frutas y vegetales ha sido asociado con una menor incidencia y mortalidad por diferentes enfermedades crónicas. La protección que las frutas y vegetales brindan contra las enfermedades degenerativas como cáncer y enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, ha sido atribuida a su alto contenido de varios antioxidantes.

Los radicales libres están implicados en la causa de estas enfermedades por ocasionar daño oxidativo a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Es por esto que los antioxidantes, los cuales neutralizan la acción de los radicales libres, desempeñan una función fundamental en la prevención de estas enfermedades.

La medición de los antioxidantes individuales por separado no permite conocer con certeza la capacidad antioxidante total de un fluido biológico por los efectos sinérgicos que puedan establecerse entre los antioxidantes presentes en él.

Diferentes métodos se han desarrollado para determinar la capacidad antioxidante de fluidos, son todos métodos de inhibición, donde se usa una especie generadora de radicales libres y una sustancia que detecta estas especies. La actividad antioxidante de la muestra añadida inhibe la generación de estos radicales (Pineda Alonso *et al.*, 1999).

2.3.4 Ensayo del Ácido 3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico (ABTS)

También conocido como el método de TEAC, es uno de los métodos más utilizados para la determinación de la capacidad antioxidante total. Se basa en la neutralización del catión radical formado por la oxidación del cromóforo sintético ABTS a su forma radical $ABTS^{\bullet+}$ cuyo máximo de absorbancia se encuentra a los 734 nm. El radical reacciona rápidamente con donadores de electrones e hidrógeno, resultando en la decoloración del catión radical. Un decremento en la

concentración del radical es directamente proporcional a la concentración del antioxidante.

2.3.5 Electroforésis

Es un método generalmente empleado en la determinación de la pureza en proteínas después que estas han sido purificadas. Consiste en la migración de las moléculas de proteínas de un campo eléctrico, donde su velocidad de migración depende de la fuerza del campo, carga neta, tamaño y forma de las moléculas, así como la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en el cual las moléculas se están moviendo (Lora Sánchez, 2007).

2.3.5.1 Análisis electroforético desnaturizante (SDS-PAGE)

Es una técnica empleada para la separación de proteínas, compuesto por un gel discontinuo de poliacrilamida como soporte y dodecil sulfato de sodio (SDS) como desnaturizante de proteínas. El SDS es un detergente aniónico y cuando se disuelven sus moléculas presentan carga negativa neta en un amplio intervalo de pH. La cadena polipeptídica enlaza cantidades de SDS en proporción a su masa molecular relativa. Las cargas negativas del SDS destruyen la estructura de la proteína por lo que son fuertemente atraídas al ánodo (electrodo cargado positivamente) en un campo eléctrico.

Los geles de poliacrilamida restringen la migración de moléculas grandes haciendo que las moléculas pequeñas migren rápidamente, la separación final de las proteínas es casi dependiente de la diferencia de la masa molecular relativa, ya que la densidad de carga (relación carga-masa) se mantiene aproximadamente constante para todos los tamaños de proteína (Lora Sánchez, 2007).

2.4 Enzima

Se considera que una enzima es una proteína con propiedades catalíticas debido a su poder de activación específico. Las enzimas catalizan las reacciones metabólicas que tienen lugar en el interior de las células de organismos vivos, por

lo que su actividad catalítica se desarrolla en las condiciones de un medio de reacción biológico.

Las enzimas se clasifican según su actividad catalítica y el sustrato al que atacan. Las hidrolasas catalizan reacciones en las que se adiciona agua a un sustrato, de manera que moléculas de gran tamaño son divididas en unidades más pequeñas. Estas enzimas catalizan la ruptura de enlaces peptídicos en proteínas y polipéptidos (proteasas), enlaces glicosídicos en carbohidratos (amilasas, celulasas, etc.) y enlaces tipo éster en lípidos (lipasas). (Prieto Velazco, 2007).

A su vez, las proteasas pueden clasificarse según:

Su origen: animal, vegetal, bacteriano o fúngico.

Su acción catalítica: 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.

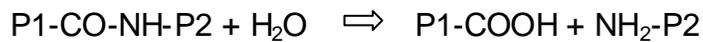
La naturaleza del centro catalítico: las endopeptidasas pueden ser serinoproteasas, cisteinaproteasas, metaloproteasas y aspartatoproteasas (Prieto Velazco, 2007).

La enzima endoproteasa de origen bacteriano es distribuida por Sigma-Aldrich Co. Es una subtilisina procedente de la fermentación controlada de cepas seleccionadas de *Bacillus licheniformis*. La subtilisina es una serino-proteasa, tiene una estructura primaria de 275 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 22500 Da. Una característica de esta enzima es que esta purificada por cristalización. El rango de pH en el que la enzima presenta actividad está entre 7 y 10. El rango de temperatura varía entre 25 y 70 °C y no es necesario utilizar activadores (Prieto Velazco, 2007).

2.5 Proteólisis

La proteólisis es el rompimiento hidrolítico de las proteínas para hacerlas más simples, como sustancias solubles y amino ácidos, en otras palabras; la proteólisis es directamente la degradación o digestión bioquímica de proteínas a través del rompimiento de las cadenas peptídicas de amino ácidos por una hidrólisis; este proceso es llevado a cabo por enzimas llamadas proteasas o por digestión intramolecular con ácidos fuertes.

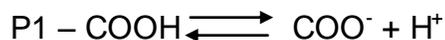
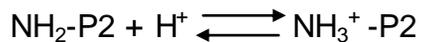
La reacción de hidrólisis consiste en la ruptura del enlace existente entre los aminoácidos que componen una cadena peptídica, incorporando una molécula de agua por cada enlace roto. Las proteasas catalizan esta ruptura del enlace peptídico (Guadix *et al.*, 2000).



Su actuación continuada sobre la proteína da lugar a las siguientes especies intermedias:



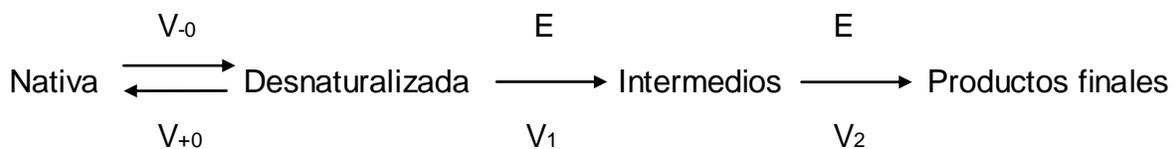
La hidrólisis del enlace peptídico supone además la liberación de los grupos amino y carboxilo terminales, estableciéndose los siguientes equilibrios ácido-base en el medio:



Por tanto, el estado de protonización de una proteína depende del pH del medio. Los valores de pK a 25°C de los grupos amino y carboxilo en el polipéptido se estiman entre 3.1 – 3.6 y 7.5 – 7.8, respectivamente. A valores de pH superiores a 7.5 – 7.8, los grupos carboxilo estarán totalmente disociados y

parcialmente los grupos amino (Guadix *et al.*, 2000). Por tanto, la rotura de un equivalente de enlaces conduce a una liberación de 0.5 -1.0 equivalentes de protones, es decir, el pH disminuirá. En el caso de pH inferiores a 3.1 – 3.6 ocurrirá lo contrario y el pH aumentará. En definitiva, si la hidrólisis se produce a valores de pH fuera del rango dado por los valores de pK de los grupo amino y carboxilo, será necesaria la adición de base o de ácido para mantener el pH constante (Prieto Velazco, 2007).

Para la hidrólisis de proteína, la unión sustrato-enzima es esencial. En el caso de proteínas globulares, la mayoría de los enlaces peptídicos están localizados en el interior de la proteína y no son accesibles para la enzima, por esto, se considera que para proteínas globulares es necesario efectuar la desnaturalización de la proteína antes de proceder a hidrolizarla, ya que después de la desnaturalización estarán expuestos más enlaces peptídicos. En solución, las proteínas en estado plegado (nativo) y no plegado (desnaturalizadas) están en equilibrio. Solamente las moléculas no plegadas son susceptibles a degradación por enzimas proteolíticas, como se representa esquemáticamente a continuación según la teoría de Linderstrom-Lang:



V= Velocidades de reacción, E= Enzima

Si la velocidad de desnaturalización [$V_0 = (V_{+0}) - (V_{-0})$] es menor que v_1 , la etapa de desnaturalización es la etapa limitante de la velocidad de hidrólisis y cada proteína desnaturalizada será rápidamente hidrolizada hasta los productos finales. El hidrolizado resultante, además de contener ambas proteínas intactas, contendrá los productos finales, aunque serán deficientes en péptidos de tamaños

intermedios. Este tipo de reacción está designada como una reacción “en etapas sucesivas”. Si, además, la desnaturalización de la proteína es más rápida que la hidrólisis ($v_1 < v_0$), las moléculas de la proteína serán degradadas a intermedios pero posteriormente son degradadas lentamente en productos finales. Este tipo de reacción es llamada de “cremallera”, obteniéndose un hidrolizado que contiene principalmente péptidos de tamaño intermedio. Ambos mecanismos de hidrólisis están implicados en la mayoría de las reacciones proteolíticas. Si la proteína se desnaturaliza irreversiblemente antes de la hidrólisis, el número de enlaces de péptidos disponibles se incrementa notablemente y la degradación de la proteína debería proceder de acuerdo con un tipo de reacción “cremallera”. Para estas proteínas desnaturalizadas otros factores tales como la disminución de la solubilidad media influyen en la velocidad de reacción inicial (Benítez *et al.*, 2008).

2.6 Hidrolizados de Proteínas

La hidrólisis resulta en la modificación de la estructura de las proteínas alimenticias mediante hidrólisis enzimática permite mejorar las propiedades funcionales, nutricionales e inmunológicas del alimento original sin perder valor nutritivo. La hidrólisis mejora la solubilidad, el poder espumante y la capacidad emulsificante de las proteínas. Aumenta su digestibilidad y reduce el carácter alergénico. Además, mediante hidrólisis enzimática se obtienen determinados péptidos de actividad biológica demostrada que se emplean en la formulación de nuevos productos proteicos de alto valor agregado conocidos como alimentos funcionales. Por todo ello, el proceso de hidrólisis enzimática de proteínas es de gran interés para la industria alimentaria, siendo los hidrolizados ampliamente utilizados en la fabricación de alimentos preparados, productos dietéticos y nutrición infantil y clínica (Prieto Velazco, 2007), como ejemplos se tiene a los hidrolizados de gluten de trigo y de maíz, que se utilizan como potenciadores de sabor o agentes emulsificantes. También se emplean con este fin en sopas, salsas y comidas precocinadas los hidrolizados de proteínas de origen cárnico (Prieto Velazco, 2007).

La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso popular usado en una gran variedad de productos con propiedades funcionales y bioactivas superiores que las de las proteínas nativas. El hidrolizado enzimático es uniforme, puede contener menos aminoácidos libres, contiene menos cenizas y limita la destrucción de los aminoácidos sensibles a pH's extremos. Además, cuando las propiedades de la hidrólisis enzimática son bien entendidas, el producto es mejor diseñado con enzimas que con químicos. Los hidrolizados de proteínas recientemente han recibido mayor atención debido a los péptidos bioactivos liberados de proteínas no bioactivas y representando prospectos para elaborar alimentos funcionales y nutracéuticos (Cheison *et al.*, 2007).

Recientemente se encontró que los hidrolizados de dos variedades de frijol común (Pinto Durango y Negro 8025) mostraron péptidos con alta capacidad antioxidante así como capacidad anti-inflamatoria (Oseguera *et al.*, 2009).

Uno de los recientes problemas para ser resueltos es explicar las razones y determinar los factores responsables del incremento en número de varios casos de alergias. Al parecer estas propiedades alergénicas están relacionadas con las proteínas y la longitud de su cadena peptídica, por lo que las fracciones de proteínas de bajo peso molecular no inducen alergenicidad y son bien toleradas por organismos humanos, incluso en bebés recién nacidos. Estos oligopéptidos también tienen un alto valor nutricional como una mezcla equivalente de aminoácidos libres.

Los hidrolizados de proteínas son aplicados en pacientes con gastritis crónica, enteritis y fenilcetonuria (después de una previa separación de la fenilalanina contenida en los péptidos). Estos están agregados para enriquecer el valor nutricional de los alimentos preparados, y mayor energía en las bebidas usadas por los deportistas. Adicionalmente, los péptidos cortos están caracterizados por su sabor fuerte como de aminoácidos simples, que dependen de la secuencia de aminoácidos y composición por lo que pueden agregar sabor dulce, ácido, etc. a productos alimenticios (Trusek-Holownia, 2008).

En la hidrólisis de proteínas por lote, la enzima es usada sólo una vez seguida de una inactivación, lo que genera un elevado costo en el proceso, hay variaciones de lote a lote en las características de los hidrolizados y las condiciones usadas para inactivar la enzima en el final del proceso de hidrólisis presenta la posibilidad de generar grandes cambios en el resultado de los hidrolizados como son productos como lisina-alanina. A la inversa, la ultrafiltración en reactores enzimáticos de membrana reducen o eliminan los cuellos de botella asociados con los reactores de hidrólisis por lote (Cheison *et al.*, 2007).

2.7 Medida del grado de hidrólisis

El criterio cuantitativo para la medida del avance de la reacción proteolítica es el grado de hidrólisis, que se define como la relación entre el número de enlaces peptídicos rotos y el número total de enlaces peptídicos en la proteína.

Existen diferentes métodos para medir el grado de hidrólisis (Cheison *et al.*, 2009). Estos se basan fundamentalmente en 1) la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético (TCA), 2) la determinación de los grupos α -amino libres, 3) la valoración del protón liberado tras la ruptura del enlace peptídico a determinados valores de pH y 4) la medida del descenso del punto crioscópico (Prieto Velazco, 2007).

Determinación del nitrógeno soluble: las técnicas más usuales son el método Kjeldhal, la reacción de Biuret o la determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos con grupos aromáticos (Guadix *et al.*, 2000).

Determinación de los grupos α -amino libres: la técnica más antigua es la reacción con ninhidrina, aunque presenta problemas de interferencias con amonio y una elevada duración. Otro reactivo empleado es el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Este método presenta importantes inconvenientes: alto color en blancos, contaminación del TNBS con ácido pícrico, interferencia de azúcares reductores y amonio, falta de reactividad de la prolina e hidroxiprolina así como la alteración de los resultados por la reacción de los grupos ϵ -amino de lisina con el reactivo. También el ortofenilaldehído (OPA) se

ha empleado como reactivo, aunque el inconveniente de no reaccionar con prolina y solo parcialmente con la cisteína (Guadix et. al, 2000; Benítez *et al.*, 2008).

Valoración del protón. Técnica del pH-estado: Como se ha expuesto anteriormente la reacción de hidrólisis de proteínas transcurre con liberación o consumo de protones. Por ello el control de la hidrólisis enzimática puede ser realizado por medida del consumo de agente neutralizante necesario para mantener constante el pH. Cabe destacar que solo el método del pH-estado permite determinar el grado de hidrólisis de forma continua (Guadix *et al.*, 2000; Prieto Velazco, 2007).

Descenso del punto crioscópico: el proceso de hidrólisis da lugar a la aparición de nuevas especies y por tanto a un aumento de la osmolalidad. Esto permite la determinación del grado de hidrólisis mediante medida del descenso en el punto crioscópico de la mezcla (Guadix *et al.*, 2000).

2.8 Definición de biorreactor

Un biorreactor químico es una unidad procesadora diseñada para que en su interior se lleve a cabo una o varias reacciones químicas. Dicha unidad procesadora está constituida por un recipiente cerrado, el cual cuenta con líneas de entrada y salida para sustancias químicas, y está gobernado por un algoritmo de control.

Los biorreactores químicos tienen como funciones principales:

- Asegurar el tipo de contacto o modo de fluir de los reactantes en el interior del tanque, para conseguir una mezcla deseada con los materiales reactantes.
- Proporcionar el tiempo suficiente de contacto entre las sustancias y con el catalizador, para conseguir la extensión deseada de la reacción.

- Permitir condiciones de presión, temperatura y composición de modo que la reacción tenga lugar en el grado y a la velocidad deseada, atendiendo a los aspectos termodinámicos y cinéticos de la reacción.

2.9 Tipos de reactores para hidrólisis de proteínas

Existen infinidad de tipos de biorreactores químicos, y cada uno responde a las necesidades de una situación en particular. El método más común, usado en el pasado y en el presente, para la producción de hidrolizados de proteínas es el reactor discontinuo agitado.

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

2.9.1 Reactor tipo Lote

La hidrólisis de proteínas en reactores discontinuos (tipo lote) implica:

- Alto costo asociado al uso de grandes cantidades de enzima. En el proceso discontinuo, el sustrato y la enzima son mezclados en una suspensión que se mantiene a temperatura y pH óptimos durante varias horas. Después de alcanzar el grado de hidrólisis deseado, la enzima es inactivada cambiando el pH o aumentando la temperatura. Por lo tanto la enzima no puede ser recuperada.
- Los procesos discontinuos son lentos y raramente llegan a una conversión óptima debido a la inhibición por producto, lo cual conduce a bajos rendimientos y productividad.
- Las propiedades funcionales del producto final son difíciles de controlar; el producto no es uniforme y puede contener componentes de peso molecular variable. Además, la hidrólisis descontrolada o excesiva puede generar

malos sabores y amargor. El amargor se hace más pronunciado cuando se producen péptidos hidrofóbicos de bajo peso molecular, especialmente con proteínas de soya y caseína.

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

- Simplicidad de diseño y operación.
- No es necesario un equipamiento de control costoso.
- Flexibilidad de la operación.
- Es posible manejar grandes cantidades de sustrato insoluble a altas concentraciones (Guadix Escobar, 2001; Prieto Velazco, 2007).

2.9.2 Reactores de membrana

Son aquellos que combinan la reacción y la separación en una sola unidad; la membrana selectivamente remueve una (o más) de las especies reactantes o productos. Estos reactores han sido comúnmente usados para aplicaciones en las cuales los rendimientos de la reacción están limitados por el equilibrio. También han sido propuestos y usados para otras aplicaciones; para incrementar el rendimiento y la selectividad de reacciones enzimáticas y catalíticas influyendo a través de la membrana sobre la concentración de una (o más) especies intermedias, removiéndolas selectivamente (o ayudando a mantenerlas en una concentración baja), evitando la posibilidad de que dichos compuestos envenenen o desactiven el catalizador y para proveer una interface controlada entre dos o más reactantes (Mendiburu Díaz, 2000).

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

- Reactores de flujo pistón o de fibra hueca, donde el biocatalizador es inmovilizado o atrapado en un lado de la membrana, normalmente el lado de la carcasa.

- Reactores continuos de membrana agitados, donde el biocatalizador y el sustrato se encuentran mezclados en el recipiente de reacción y el producto se recoge a través de la membrana. Este tipo de biorreactor puede convertir sustratos de alto peso molecular (como carbohidratos y proteínas).

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

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

El reactor continuo de membrana agitado se diferencia del de celda en el hecho de que el módulo de membrana está físicamente separado del recipiente de reacción. Un reactor de este tipo está acoplado en un lazo semicerrado mediante una bomba con el módulo de ultrafiltración. El contenido del recipiente de reacción es continuamente bombeado a través de la membrana y reciclado al recipiente. El corte molecular de la membrana debe ser lo suficientemente bajo para retener la enzima pero lo suficientemente grande para permitir al producto permear a través de los poros y salir del sistema. El volumen total del sistema se mantiene constante igualando el caudal de entrada de sustrato con el flujo de permeado. Puesto que la mayoría de las enzimas están en el rango entre 10 y 100 kDa, se usan membranas de estos cortes de peso molecular (Guadix Escobar, 2001).

2.9.3 Biorreactor de Membrana de placa

El biorreactor usado en el experimento es de la marca Sterlitech y el modelo es SEPA CF II, es un biorreactor a escala de laboratorio que trabaja con filtración por medio de membranas, sus parámetros de operación son los siguientes:

- Área de membrana efectiva (140 cm²)
- Volumen de retenido 70 ml
- Presión máxima 69 bar (1000 psig)
- Temperatura máxima 177°C (350°F)
- Anillos marca Viton
- Intervalo de pH Dependiente de la membrana
- Velocidad del flujo cruzado Variable

Algunas de las aplicaciones del biorreactor SEPA CF II son:

Biomédicas

- Purificación de enzimas
- Separación y concentración de proteínas
- Concentración celular
- Concentración de antibióticos
- Separación de plasma

Alimentos

- Concentración de suero y leche
- Clarificación y esterilización en frío de jugo de frutas
- Concentración de azúcares/almidones
- Purificación de dextrosa
- Recuperación de soya de suero

Procesos Químicos

- Fraccionamiento químico
- Concentración, fraccionación y purificación de compuestos orgánicos
- Recuperación de materiales valiosos

Otras aplicaciones

- Concentraciones ácidas
- Purificaciones ácidas
- Concentración de desalinización de agua salada
- Remoción de coloides de sílica
- Purificación de colorantes
- Procesos de pintura ED (Electrodeposición)
- Desalinización de agua salada a baja presión
- Separación de compuestos orgánicos de agua/aceite
- Desalinización de agua de mar

La configuración del sistema del SEPA CF II consta de 3 componentes básicos, que son: el cuerpo de la celda, la bomba de alimentación y el soporte de la celda. El esquema se observa en la Fig. 2.7.

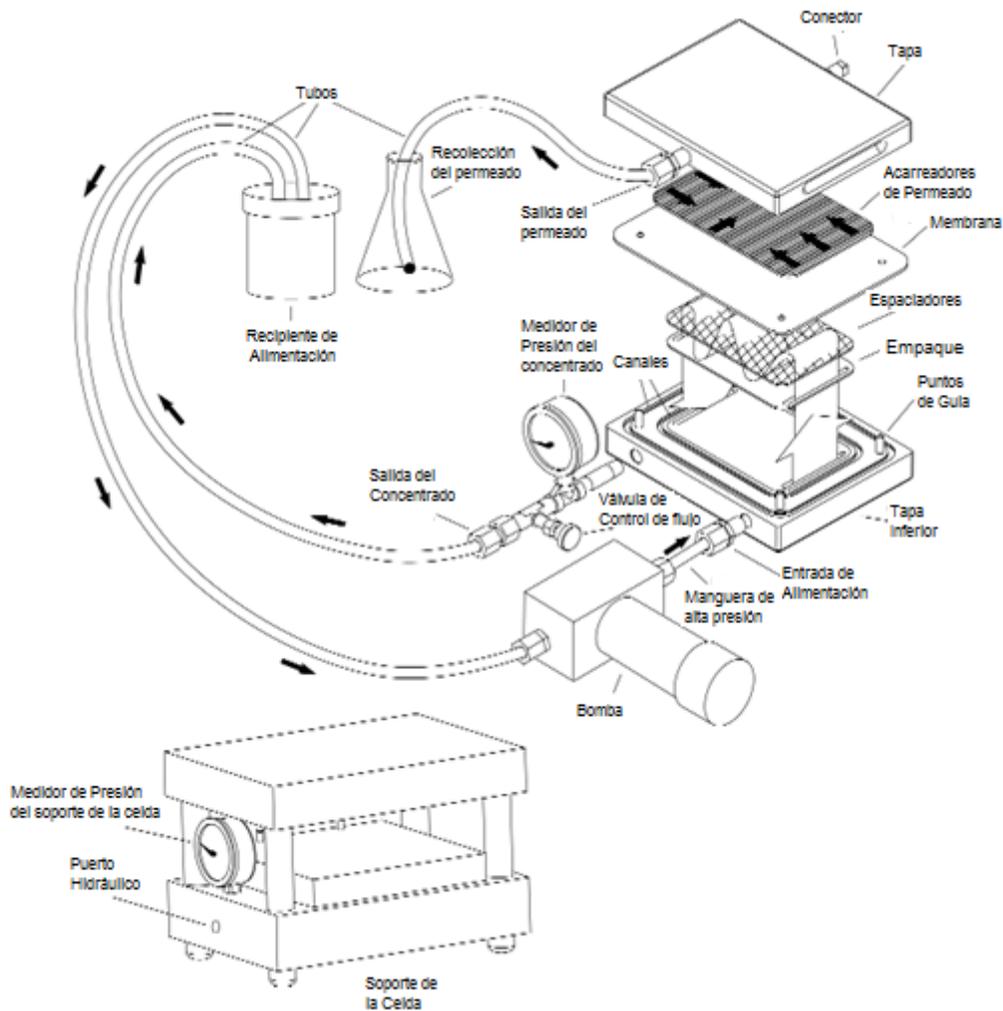


Fig. 2.2 SEPA CF II Elementos de la membrana de la celda
Componentes principales y flujo de secuencia

Extraído del manual del SEPA CF II

2.10 Definición de Membrana

En el sentido más general, una membrana sintética es una barrera por la cual se separan dos fases y se restringe el transporte de varias especies químicas y bioquímicas en intervalo específico seleccionado. Una membrana puede ser homogénea o heterogénea, tener estructura simétrica o asimétrica; también puede ser sólida o líquida, puede ser neutral, puede llevar cargas negativas o positivas o

también puede ser bipolar. Tienen diferente ancho que puede variar entre menos de 100 nm a más de 1 centímetro. La resistencia eléctrica puede variar desde muchos megohms hasta a una fracción de un ohm. El transporte de masa a través de la membrana puede ser causado por convección o por difusión de moléculas individuales, inducidas por un campo eléctrico, o una concentración, o por un gradiente de presión o temperatura.

Todos los materiales que funcionan como membranas tienen una propiedad característica en común: limitar el paso de varias especies químicas en una forma muy específica (Barona, 2007).

La producción de alta calidad de proteínas de suero de leche usando la tecnología de separación por membranas es ampliamente industrializada (Cheison *et al.*, 2006).

2.11 Filtración

La filtración es un proceso de separación por presión usando membranas para separar los componentes en soluciones líquidas o suspensiones en base a su tamaño y diferencia de cargas.

La filtración se puede clasificar dentro de dos diferentes modos de funcionamiento; el modo normal o filtración de flujo convencional y filtración de flujo tangencial de membrana. La diferencia básica en el flujo de fluidos entre estos dos modos se ilustra en las Fig. 2.3 y 2.4 (Barona, 2007).

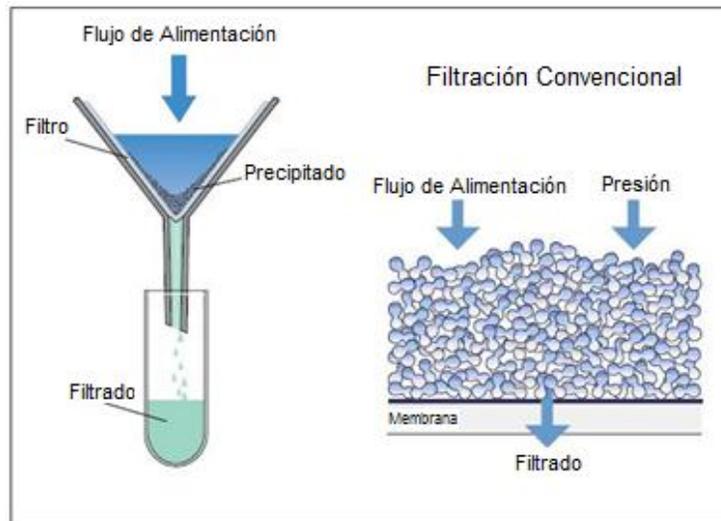


Fig. 2.3 Filtración convencional
Adaptado de Barona, 2007

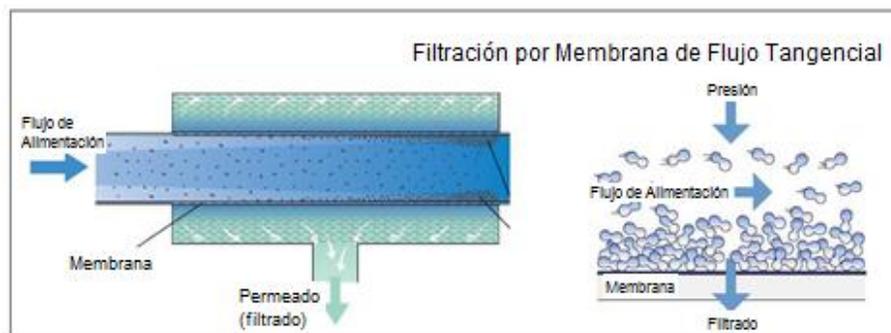


Fig. 2.4 Filtración tangencial de flujo de membrana
Adaptado de Barona, 2007

Es importante tener en cuenta que la filtración de flujo convencional, se utiliza generalmente para la separación de partículas en suspensión de más de $10\mu\text{m}$, mientras que la filtración por membrana de flujo tangencial separa sustancias de tamaño molecular inferior a $10^{-4}\mu\text{m}$ (Barona, 2007).

2.12 Fenómenos de polarización de la concentración y colmataje

A medida que transcurre el tiempo en un proceso de membranas, se registra una disminución progresiva del volumen del flujo de permeado debido a toda una serie de fenómenos que ocurren simultáneamente. En los primeros instantes se registra un rápido decline atribuible a un fenómeno denominado “polarización de la concentración”; este consiste en la formación de una alta concentración de soluto en la superficie adyacente a la membrana. Esto es provocado por un balance entre el transporte convectivo de los solutos efectuado por el flujo de solvente, y por la acumulación de soluto no permeado a través de la misma membrana (Chacón-Villalobos, 2006).

Al avanzar en el proceso de filtración, se va formando sobre la membrana una capa de materiales acumulados, que dificultan la eficiencia del proceso. Los materiales acumulados en la membrana pueden experimentar cuatro fenómenos que no necesariamente ocurren de manera independiente:

- Adsorción en la membrana
- Bloqueo superficial de los poros
- Formación de una capa superficial a lo largo de toda la membrana
- Penetración profunda de los poros provocando bloqueos internos no reversibles, siendo más acentuado este último problema entre mayor sea el diámetro del poro.

Las tecnologías tangenciales de membranas presentan una primera solución al problema del colmataje, pues al existir un flujo que circula paralelamente a la superficie, el mismo actúa las veces de un barrido tangencial que reduce la formación de colmatados; es aquí precisamente que la velocidad de flujo tiene también un impacto importante. El adecuado manejo de la presión transmembranaria suele ser importante en términos de reducir el impacto del colmataje, pues un efecto de compresión bajo una presión muy acentuada

provocaría un agudo incremento en la resistencia hidráulica de la capa colmatante, y una disminución de la selectividad de la membrana (Chacón-Villalobos, 2006).

2.13 Procesos de separación por membranas

El filtrado de membrana por flujo tangencial (TFMF) se puede subdividir en categorías basadas en el tamaño de los componentes separados. Para el procesamiento de proteínas, estos pueden ir desde el tamaño de las células intactas para neutralizar las sales. En la Fig. 2.5 se observan los componentes típicos que pueden ser retenidos por una membrana y cuales pueden pasar a través de la membrana para cada una de las subdivisiones (Barona, 2007).

El intervalo del tamaño del poro de la membrana, por lo general tiene un valor de un micrón, indica que las partículas más grandes del intervalo serán retenidas por la membrana. Un MWCO (Molecular Weight cut off, peso molecular libre de corte), por otra parte, indica que la mayoría de las macromoléculas disueltas con pesos moleculares superiores al MWCO y con algunos pesos moleculares inferiores a este serán retenidos por la membrana. Las membranas de diferentes fabricantes utilizan diferentes criterios para asignar las puntuaciones MWCO a la familia de membranas.

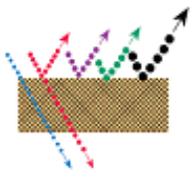
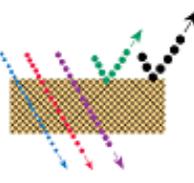
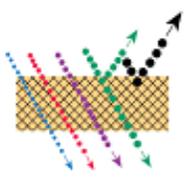
Procesos de Separación	Osmosis Inversa	Nano filtración	Ultrafiltración	Microfiltración
Componentes retenidos por membrana	Proteínas Bacterias Minerales Azúcares (lactosa)	Proteínas Bacterias Azúcares (lactosa)	Proteínas Bacterias	Bacterias
Permitidos				
Componentes que pasan a través de la membrana (permeado)	iones de agua	iones de agua Minerales	iones de agua Minerales Péptidos pequeños Azúcares (lactosa)	iones de agua Proteínas Minerales Péptidos pequeños Azúcares (lactosa)
Tamaño de poro de la membrana μm	$10^{-4} - 10^{-2}$	$10^{-2} - 10^{-2}$	$10^{-2} - 10^{-1}$	$10^{-1} - 10^1$
Peso molecular kD	< 1	< 1	1 - 100	500
Presión del sistema Bar	30 - 60	20 - 40	1 - 10	< 1

Fig. 2.5. Espectro de aplicaciones de procesos de separación por membrana con filtración de flujo tangencial.

Adaptado de Barona, 2007.

Existen diferentes procesos de membranas, la principal tecnología de membranas se asocia con:

2.13.1 Osmosis Inversa (RO por sus siglas en inglés)

También conocido como hiperfiltración, es la filtración más fina conocida. Este proceso permitirá la eliminación de partículas tan pequeñas como los iones de una solución. La ósmosis inversa se utiliza para purificar el agua y eliminar las

sales y otras impurezas, a fin de mejorar el color, el sabor o las propiedades del líquido (Barona, 2007).

2.13.2 Nanofiltración (NF por sus siglas en inglés)

Nanofiltración es comúnmente usada para la concentración de componentes orgánicos por remoción de partes de iones monovalentes como sodio y cloruro (desmineralización parcial) (Barona, 2007).

2.13.3 Micro filtración (MF)

La micro filtración (MF) se usa generalmente en la fase inicial de un proceso de recuperación para separar las células intactas y algunos desechos/lisados de restos de células de los componentes en la corriente de alimentación. Cualquiera de las células retenidas o las clarificadas filtradas puede ser el producto en circulación. Las más comunes aplicaciones de la micro filtración son la eliminación de bacterias y la separación de macro moléculas. El tamaño de poro utilizado para este tipo de separación es típicamente en el intervalo de 0,05 micras a 1,0 micras (Barona, 2007).

2.13.4 Diafiltración (DF)

La diafiltración es un caso particular y especializado de la ultrafiltración donde el retenido es diluido en agua y re circulado en el proceso de modo tal que se reduzca la concentración de los componentes solubles del permeado y se incremente la concentración de los componentes del retenido (Chacón-Villalobos, 2006). La diafiltración es un proceso de filtrado de membrana por flujo tangencial que se puede realizar en combinación con cualquiera de las otras categorías de separación, ya sea para mejorar rendimiento o pureza del producto. Durante la diafiltración, el buffer se introduce en el depósito de reciclado mientras el filtrado se retira de la unidad de operación (Barona, 2007).

2.13.5 Ultrafiltración

La ultrafiltración es impulsada por una presión, la permeabilidad es selectiva basada en procesos de separación con membranas que tengan los tamaños de poro desde 1 a 100 nm, se utilizan para el procesamiento de macromoléculas como las proteínas. En la Fig. 2.6 se muestra la ultrafiltración en relación con otros procesos de separación a base de membranas.

Las membranas para ultrafiltración fueron diseñadas para proveer de una alta retención de proteínas y otras macromoléculas. Estos procesos de membranas abarcan la filtración de soluciones biológicas que contienen proteínas, péptidos, aminoácidos, sales y otros componentes como ácidos orgánicos, azúcares, vitaminas, etc. (Ghosh, 2009).

Una membrana puede estar hecha para retener pequeñas moléculas, mientras moléculas mas grandes pueden pasar a través de la membrana, este fenómeno se conoce como selectividad revertida. No se puede exagerar el hecho de que la separación de solutos por ultrafiltración es muy complejo en la naturaleza, y apreciar esta complejidad es absolutamente esencial si la ultrafiltración se quiere utilizar de manera eficiente (Ghosh, 2009).

Ultrafiltración dispone de una amplia variedad de aplicaciones que van desde la transformación de las macromoléculas biológicas en el tratamiento de aguas residuales. Los alimentos y aplicaciones de la biotecnología representan casi el 40% del total actual de utilización de membranas en ultrafiltración (Ghosh, 2009). La transformación de las macromoléculas biológicas, como proteínas y ácidos nucleicos, ha asumido una importancia significativa en la industria de los bioprocesos, donde el impacto de los procesos de transformación en el proceso global de la economía es ahora más apreciado.

Desde el punto de vista operativo de la ultrafiltración se utiliza para:

1. Concentración (extracción de solventes de soluciones de proteínas)
2. Desalación (eliminación de componentes de bajo peso molecular de soluciones de proteínas)
3. Clarificación (es decir, la eliminación de partículas de soluciones de proteína)
4. Fraccionamiento (es decir, separación de proteína-proteína) (Ghosh, 2009)

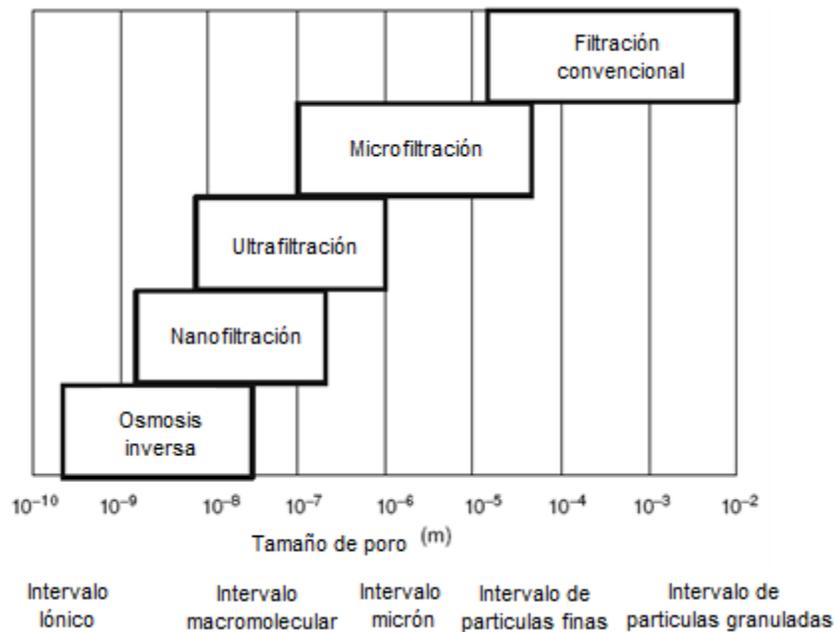


Fig. 2.6 Clasificación de los procesos de membrana
Adaptado de Ghosh, 2009

2.14 Modelo matemático

En ciencias aplicadas, es un modelo expresado por medio de ecuaciones matemáticas.

Es el tipo de modelo más importante para la ciencia y la tecnología. Es útil para la comunicación y la educación. Es la base del diseño. Tiene gran capacidad de síntesis.

Utilidad de los modelos matemáticos:

1. Análisis, comprensión y evaluación de un sistema: relación entre variables.
2. Diseño, mejoramiento, optimización: construcción de un nuevo sistema o reestructuración de un sistema existente.
3. Predicción y pronóstico del comportamiento de un sistema (normalmente a partir de la simulación), como base para la toma de decisiones.
4. Control: adición de nuevos componentes a un sistema, de manera que se obtenga un desempeño adecuado.
5. Enseñanza y comunicación: transmisión del conocimiento que se tiene de un sistema de una manera universal y objetiva.
6. Estimación de variables no medibles.
7. Prueba de hipótesis.
8. Procesamiento de señales: cancelación del ruido, compresión de datos, filtrado, interpolación.

Modelos matemáticos según su origen:

1. Teóricos o fenomenológicos. Se obtienen a partir de leyes, generalmente son difíciles de obtener, son aproximados.
2. Empíricos. Relativamente fáciles de obtener y usar, son más exactos que los teóricos (tan exactos como se desee), tienen validez limitada (según punto de operación, condiciones, etc.).
3. Mixtos. "Cajas grises", su estructura se obtiene de manera teórica y algunos de sus parámetros se obtienen a partir de datos experimentales

Realidad sobre el modelado y la simulación:

1. Un modelo matemático es sólo una aproximación de la realidad

2. Existe una gran distancia entre el mundo real y las descripciones obtenidas a partir de un modelo matemático por medio de la simulación
3. Aunque no existe una relación exacta entre la realidad y la predicción, el modelo matemático permite comparar ciertos aspectos de interés, para los cuales se construye el modelo y sólo para esos
4. El orden de un modelo matemático es sólo una muy buena simplificación matemática que no tiene explicación en el mundo real (Matemática).

2.15 Optimización de hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es usualmente desarrollada en procesos de tipo lote que genera altos costos debido principalmente a la gran cantidad de enzima requerida, la alta energía, lo largo de la reacción, el uso de reactores de gran volumen y la pérdida de enzima después de la inactivación al terminar el procedimiento (Mannheim y Cheryan, 1990; Belhocine *et al.*, 2000).

Hagerdal *et al.* mostraron que la hidrólisis de celulosa incrementa cuatro veces en un biorreactor de membrana comparado con lo obtenido en un reactor de lote convencional (Seung-Goo y Hak-Sung, 1993).

Los clásicos métodos para optimizar un proceso involucraban el cambio de una variable a la vez, manteniendo las demás fijas. Siendo unidimensional, este laborioso y tardado método además no garantiza la determinación de las condiciones óptimas. Por otra parte, la realización de experimentos con todas las posibles combinaciones factoriales de las variables de cada prueba es impráctico, debido al gran número de experimentos que serían necesarios. La dificultad aumenta cuando más de una respuesta es estudiada simultáneamente y las condiciones óptimas de respuesta pueden no ser adecuadas o imprácticas para otras respuestas (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2007).

Algunos estudios acerca de la optimización de variables físicas (sustrato y concentración de enzimas) y químicas (pH y temperatura) para hidrolizado de sustancias de pectinas por medio de enzimas ha sido desarrollado por Naidu y

Panda (1999). Sin embargo, estos experimentos se llevaron a cabo en dos series distintas, sin incluir las interacciones entre las variables físicas y químicas (Rodríguez-Nogales *et al.*, 2007).

Los parámetros importantes de diseño para el reactor de membrana son: tiempo de residencia (a veces denominado tiempo espacial), concentración de sustrato de entrada, actividad o concentración de enzima, temperatura y pH de la mezcla de reacción y relación enzima/sustrato. El tiempo de residencia del reactor es definido como el tiempo requerido para procesar un volumen de reactor de sustrato, medido en condiciones específicas. Todos los parámetros mencionados afectan a la productividad del reactor, expresada en unidades de masa de hidrolizado por unidad de volumen de reacción y tiempo (Guadix Escobar, 2001).

El diseño factorial de un conjunto limitado de variables es ventajoso en relación con el método convencional de la manipulación de un solo parámetro por prueba, ya que con frecuencia este tipo de enfoque no ubica las condiciones óptimas para el proceso debido a su incapacidad para considerar el efecto de las posibles interacciones entre factores. El diseño factorial también permite poder aprovechar los conocimientos prácticos de los procesos durante el análisis de superficie de respuesta final (Cheison *et al.*, 2007).

Los trabajos encontrados de optimización en biorreactores se realizaron en biorreactores de tipo tanque agitado, algunos de estos con membranas y los análisis estadísticos se llevaron a cabo por un análisis de superficie de respuesta cuadrático basados en la regresión lineal múltiple tomando en cuenta los efectos principales, cuadráticos, y los efectos de las interacciones de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{i=3} b_i X_i + \sum_{i=1}^{i=3} b_{ii} X_{ii}^2 + \sum_{i < j=2}^{i=3} b_{ij} X_i X_j + e$$

Donde la y es la variable dependiente (variable respuesta) para ser modelada, x_i y x_j son las variables independientes (factores), b_0 , b_i , b_{ii} y b_{ij} son los

coeficiente de regresión y e es el error (Baek y Cadwallader, 1995; Cheison *et al.*, 2006; Cheison *et al.*, 2007; Rodríguez-Nogales *et al.*, 2007).

Existen otros trabajos en donde no se utiliza la metodología de superficie de respuesta, sino se utilizan modelos cinéticos para optimizar.

La ecuación de Michaelis-Menten ha sido usada para derivar ecuaciones cinéticas que describen la actuación de los reactores enzimáticos. Esta ecuación es integrada con respecto al tiempo y combinada con un balance másico de sustrato. Se usa para describir la relación entre conversión de sustrato y los parámetros del reactor (relación enzima/sustrato, actividad de la enzima, temperatura, pH, tiempo de residencia, etc.) (Guadix Escobar, 2001).

Un estudio cinético del proceso es muy complicado debido a los varios tipos de enlaces peptídicos envueltos y sus diferentes vulnerabilidades a los ataques por las enzimas durante el proceso de la hidrólisis. Estos efectos pueden ser difíciles de interpretar mediante una ecuación cinética simple (González-Tello *et al.*, 1994).

En un trabajo realizado por Camacho *et al.*, proponen un modelo matemático en donde se integra una cinética de orden cero para la hidrólisis de proteína de suero y una cinética de segundo orden para la desactivación enzimática. Además observan la influencia de la temperatura con la constante cinética de la hidrólisis ajustada con un modelo de Arrhenius (Prieto *et al.*, 2009).

Además del uso de la cinética de Michaelis-Menten para optimizar el proceso, Trusek-Holownia sugiere que se puede realizar un balance de flujo y sustrato del sistema integrado a la cinética de Michaelis-Menten para de esta manera poder obtener un modelo matemático que permita explicar el proceso (Trusek-Holownia, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

El frijol representa una excelente opción alimenticia y nutricional y es, de hecho, un componente fundamental en la dieta común del mexicano. El suero de leche por otro lado es un desecho de la industria láctea. Son un alimento fácilmente disponible y de costo accesible; sumado a esto, los hidrolizados de frijol no han sido suficientemente estudiados. Además, la producción de estos hidrolizados de proteína puede brindar un valor agregado en base a sus capacidades funcionales.

Los hidrolizados de proteínas se preparan a partir de distintas fuentes proteicas, tanto vegetales como animales, y empleando diferentes proteasas. Según las condiciones empleadas durante su preparación y la fuente proteica utilizada, los hidrolizados contienen mezclas de péptidos en diferentes proporciones. Los hidrolizados de proteínas se emplean a escala comercial debido entre otras cosas a la reducción de antigenicidad de la proteína conseguida mediante la hidrólisis enzimática.

Actualmente no existe ningún trabajo de optimización del proceso usando un biorreactor de placas por ultrafiltración para hidrolizado de proteínas; además, la optimización de este proceso podría derivar en una mayor producción de hidrolizados, que se traduciría en una reducción de costos y en volver más competitivos los procesos actuales de producción de hidrolizados. Además, la realización de un modelo matemático ayuda a conocer más a fondo el fenómeno y a estar en posibilidad de proponer innovaciones, ya que este conjunto de ecuaciones, al usar los parámetros adecuados, permite realizar simulaciones. Por otro lado ofrece la ventaja de que el modelo matemático puede ser usado para proponer mejoras en la operación o el diseño de un mecanismo.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar y modelar matemáticamente la obtención de péptidos a partir de hidrolizados enzimáticos de proteínas utilizando un biorreactor de membrana.

4.1 Objetivos específicos

4.1.1

Evaluar un precalentamiento para la obtención de hidrolizados en un biorreactor tipo lote y uno tipo membrana.

4.1.2

Optimizar la concentración del sustrato y la concentración de enzima para la obtención de hidrolizados de suero lácteo.

4.1.3

Estudiar y estimar un modelo matemático para predecir el grado de hidrólisis de proteínas utilizando un biorreactor.

4.1.4

Identificar el perfil de los péptidos mediante un análisis electroforético unidimensional y evaluar su capacidad antioxidante.

5. METODOLOGÍA

5.1 Enzima y Sustrato (Suero de leche)

La enzima utilizada fue una endoproteasa de origen bacteriano, procedente de cepas de *Bacillus licheniformis* (CAS number: 9014-01-1) de Sigma-Aldrich.

El sustrato que se usó fue suero de leche (WPC) con una concentración de 80 % de proteína de la empresa América Alimentos S.A.

5.2 Enzima y Sustrato (concentrados de frijol)

La enzima utilizada fue una endoproteasa de origen bacteriano, procedente de cepas de *Bacillus licheniformis* (CAS number: 9014-01-1) de Sigma-Aldrich.

Se trabajó con la variedad de frijol Pinto Durango (*Phaseolus vulgaris* L.) proporcionada por el INIFAP Celaya, México de la cosecha julio 2007.

Los concentrados de proteína de frijol se obtuvieron de acuerdo a la metodología de Valentas y Levine (1991) con pequeñas modificaciones. Tres kilogramos de harina de frijol se mezclaron con 30 L de agua y se dispersaron en un molino coloidal PUC modelo N/60/S (Probst y Class, Western, Germany), el pH se ajustó a 8.0 con NaOH 0.2 M, y la extracción se llevó a 35°C por agitación. La mezcla se centrifugó a 5000 x g por 15 min a 25°C (Beckman Coulter Inc., Palo Alto, Calif., U.S.A.) y el sobrenadante contenía el extracto proteína el cual debió de filtrarse para remover desechos (mayor parte fibra) y carbohidratos. El sobrenadante se extrajo de nuevo bajo las mismas condiciones y ambas extracciones se combinaron, el pH se ajustó a 4.3 con HCl diluido, y el precipitado colectado por centrifugación a 10,000 rpm x g por 20 min. El pH fue ajustado a 8.0 con NaOH 0.2 M para solubilizar los pellets de proteína para después realizar una

segunda precipitación a pH 4.3. El sobrenadante se desecho y la proteína se liofilizo.

5.3 Preparación de los hidrolizados

5.3.1 Con Suero de leche

5.3.1.1 Con precalentamiento

Se tomaron 3 concentraciones diferentes de suero de leche que fueron de 18.73 g/L, 38.45 g/L y 81.16 g/L, todas estas disueltas en 200 ml de agua destilada, así también se consideraron 3 concentraciones diferentes de enzima que fueron de 1.59 AU/L, 3.18 AU/L y 6.36 AU/L, estas cantidades fueron basadas en una publicación hecha por González-Tello *et al.*, (1994); el precalentamiento consistió en calentar la mezcla del suero de leche en las diferentes concentraciones con 200 ml de agua destilada y mantener con agitación a 85°C por 15 minutos para desnaturalizar de manera irreversible las proteínas del suero de leche, (una vez terminado el precalentamiento la mezcla era llevada a 50 °C para comenzar la hidrólisis).

5.3.1.2 Sin precalentamiento

Se pesa la cantidad de suero de leche requerido y se agrega a un vaso de precipitado con 200 ml de agua destilada, se aplica agitación hasta lograr que la mezcla sea homogénea y una vez logrado este se calienta hasta llegar a 50°C para poder comenzar la hidrólisis. Todos los tratamientos fueron aleatorizados y se les realizó una réplica, dando dos corridas en total por condición experimental, lo que nos lleva a $18 \times 2 = 36$ ensayos en total.

5.3.2 Con Frijol

5.3.2.1 Con precalentamiento previo

Para preparar la solución de concentrado de proteína de frijol, se pesan 18.4 g de concentrado de frijol (9.752 gr. de proteína) y se agregan a un vaso de precipitado con 200 ml de agua destilada, esto se calienta con agitación hasta una temperatura de 95 °C durante 15 minutos para obtener una desnaturalización

irreversible de la mayoría de las proteínas contenidas en el concentrado de proteínas, terminado este proceso se enfría hasta llegar a una temperatura de 50°C.

5.3.2.2 Sin precalentamiento previo

Se pesan 18.4 g de concentrado de frijol (9.752 gr. de proteína) y se agregan a un vaso de precipitado con 200 ml de agua destilada, se aplica agitación hasta lograr una mezcla homogénea, terminado este proceso se calienta hasta llegar a una temperatura de 50°C.

5.5 Obtención de los hidrolizados

5.5.1 En biorreactor tipo Lote para suero de leche

Preparado los diferentes tratamientos como se mencionó anteriormente (concentración del sustrato, concentración de la enzima, con o sin precalentamiento), se colocó la mezcla en un baño maría con recirculación para mantener constante la temperatura a 50 °C durante 180 minutos, el pH se mantuvo constante adicionando NaOH al 0.5 N, la mezcla se mantuvo en constante agitación, y la enzima se agregó cuando la mezcla se mantuvo constante a una temperatura de 50 °C y un pH de 8, se tomó esta temperatura y este pH en base a un trabajo realizado por González-Tello en donde presenta que este pH y temperatura son las que corresponden a las condiciones de máxima actividad y estabilidad para la enzima (González-Tello *et al.*, 1994). A partir del momento de la adición de la enzima se tomó como tiempo 0 y se considera que da comienzo la hidrólisis. Se tomaron muestras a partir del tiempo 0 cada 5 minutos hasta el tiempo 180.

5.5.2 Biorreactor tipo Lote para Frijol

Preparados los tratamientos como se mencionó anteriormente (con o sin precalentamiento), se colocó la mezcla en un baño maría con recirculación para mantener constante la temperatura a 50 °C durante 180 minutos, el pH se

mantuvo constante adicionando NaOH al 0.5 N, la mezcla se mantuvo en constante agitación, y la enzima se agregó cuando la mezcla se mantuvo constante a una temperatura de 50 °C y un pH de 8, de igual forma que para el suero de leche, se tomó esta temperatura y este pH en base a un trabajo realizado por González-Tello, (1994) en donde presenta que este pH y temperatura son las que corresponden a las condiciones de máxima actividad y estabilidad para la enzima (González-Tello *et al.*, 1994). La cantidad de enzima agregada fue de 18.36 AU/L y de 13.77 AU/L y a partir del momento de la adición de la enzima se tomó como tiempo 0 y se considera que da comienzo la hidrólisis. Se tomaron muestras a partir del tiempo 0 cada 5 minutos hasta el tiempo 180.

5.5.3 Biorreactor de membrana para frijol

Primeramente se prepararon como se mencionó anteriormente los diferentes tratamientos (con o sin precalentamiento), la mezcla se colocó en un baño maría con recirculación para mantener constante la temperatura a 50°C durante 180 minutos, el pH se mantuvo constante adicionando NaOH al 0.5 N, la mezcla se mantuvo en constante agitación y la enzima se agregó cuando la mezcla se mantuvo constante a una temperatura de 50 °C y un pH de 8. La cantidad de enzima agregada fue de 18.36 AU/L, dando una concentración enzima:sustrato de 1:243. Una vez agregada la enzima se tomó como tiempo cero.

La ultrafiltración se llevó a cabo de manera constante durante el transcurso de la hidrólisis, en donde a través de la membrana se llevó a cabo la separación del producto y de la enzima.

5.5.3.1 Selección de membrana

La membrana fue elegida en base al tamaño medio que presenta la faseolina, ya que la faseolina representa de un 40-50 % del total de proteínas contenidas en el frijol (Montoya *et al.*, 2008). Su peso molecular se encuentra dentro del rango de 43 a 53 kDa (Yeboah *et al.*, 1999). También se tomó en cuenta el tamaño de la enzima, que en este caso es una Alcalasa que tiene una

estructura primaria de 275 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 22500 Da (Prieto Velazco, 2007). Por lo que se tomo un tamaño de poro lo suficientemente pequeño para que no pudieran pasar las proteínas de gran tamaño ni la enzima, la membrana que se eligió fue la HFK-131 del catálogo de sterlitech, es una membrana de polisulfona con un tamaño de poro de 10000 MWCO (Da).

5.5.3.2 Obtención de hidrolizados con recirculación

A partir del tiempo cero, el producto obtenido por la línea de filtrado se volvió a mezclar con el vaso de reacción en donde se encontraba el retenido con la enzima, tomando únicamente a determinados tiempos el producto en tubos eppendorf para su posterior análisis, los tiempos a los que se tomó el producto fueron: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos.

5.5.3.3 Obtención de hidrolizados sin recirculación

A partir del tiempo cero, el producto obtenido por la línea de filtrado se recogió en un vaso de precipitado, tomando muestra del producto cada 5 minutos en tubos eppendorf hasta que el vaso de reacción se vació casi por completo.

5.6 Grado de Hidrolisis

El grado de hidrólisis se midió mediante la aplicación de dos métodos para el frijol, el primero de ellos fue el método de pH estado y el segundo el método de OPA, para medir el grado de hidrólisis del suero de leche solo se utilizó el método del pH estado.

5.6.1 pH-estado

Se define h como el número de equivalentes de enlaces peptídicos rotos por gramo de proteína y h_{tot} como el número total de equivalentes de enlaces peptídicos por gramo en la proteína nativa. Por tanto, el grado de hidrólisis de una proteína (DH) puede calcularse según:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100$$

El valor h_{tot} se calcula sobre la base de la composición de aminoácidos de la proteína. Para la mayoría de proteínas alimentarias, el peso molecular medio de los aminoácidos es aproximadamente 125 g/mol, de manera que el valor de h_{tot} se sitúa alrededor de 8 equivalentes por kg de proteína.

La técnica del pH-estato permite correlacionar grado de hidrólisis con la cantidad de base añadida para mantener constante el pH (Prieto Velazco, 2007) según la siguiente ecuación:

$$DH = \frac{V_B \cdot N_B}{M_P} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

Donde:

V_B es el volumen de base consumida (ml)

N_B es la normalidad de la base

M_P es la masa de proteína total

H_{tot} es el número total de enlaces peptídicos (eq/g proteína)

α es el grado de disociación de los grupos amino liberados durante la hidrólisis.

Este grado de disociación es función del Ph del medio y del pK medio de los grupos α -amino liberados y puede calcularse según:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}}$$

En el cuadro 5.1 se muestran los valores del grado de disociación del grupo amino para diferentes temperaturas y pH.

Cuadro 5.1 Grado de disociación para proteínas en función de la temperatura y el pH

pH	Temperatura (°C)					
	40	50	60	70	75	80
6.5	-	0.2	0.29	0.39	0.44	0.50
7.0	0.33	0.44	0.55	0.67	0.71	0.76
7.5	0.61	0.71	0.80	0.86	0.89	0.91
8.0	0.83	0.89	0.93	0.95	0.96	0.97
8.5	0.94	0.96	0.97	0.98	0.99	0.99

Adaptado de Prieto Velázco, 2007

Para calcular el grado de hidrólisis por este método se consideraron las α y h_{tot} de soya (Campbell y Glatz, 2009).

5.6.2 Método de OPA

El porcentaje del grado de hidrólisis (%DH) fue calculado usando la siguiente fórmula:

$$DH\% = \frac{100 n}{N} \quad (3)$$

Donde n es la media de enlaces peptídicos hidrolizados, N es el número total de enlaces peptídicos por molécula de proteína.

Donde n es:

$$n = \frac{\Delta Abs M d}{\epsilon c} \quad (4)$$

Donde ΔAbs es la absorbancia de la muestra sin hidrolizar a 340 nm, M es la masa molecular de la proteína (Da), d es el factor de dilución, ϵ es el coeficiente molar de extinción a 340 nm ($6000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y c es la concentración de proteína (g/L).

Tomando en cuenta que se tiene una mezcla heterogénea de diferentes proteínas se hizo un estimado de la media de enlaces peptídicos por molécula de proteína de frijol (N) y la media de la masa molecular de las proteínas en el concentrado de frijol (M).

Ahora combinando las ecuaciones (3) y (4) e insertando los valores calculados de M y N, se obtiene la siguiente ecuación:

$$DH\% = 100 \left[\frac{\Delta Abs M d}{\frac{6000c}{N}} \right]$$

Esta fórmula fue usada para todos los subsecuentes cálculos del grado de hidrólisis por el método de OPA (Spellman *et al.*, 2003).

La solución de OPA fue preparada como sigue: 7.620 g di-Na tetraborato decahidratado y 200 mg de Na-dodecil-sulfato (SDS) fueron disueltos en 150 ml de agua desionizada. La solución fue completamente disuelta antes de continuar. 160 mg de o-phthaldialdehído 97% (OPA) fue disuelto en 4 ml de etanol. La solución de Opa fue entonces transferida a la solución antes mencionada adicionando un poco de agua desionizada. 176 mg de ditioneitol 99% (DTT) fue adicionado a la solución agregando un poco de agua desionizada. Finalmente se afora toda la solución a 200 ml con agua desionizada.

El estándar de serina fue preparado como sigue: 50 mg de serina fue diluida en 500 ml de agua desionizada (0.9516 meqv/L).

La solución de la muestra fue preparada como sigue: X gramos de muestra fueron disueltos en 100 ml de agua desionizada. X es de 0.1 a 1.0 gr de muestra que contiene de 8 a 80 % de proteína.

Procedimiento:

La lectura en el espectrofotómetro es a los 340 nm usando agua desionizada como el control.

Tres microlitros de solución de OPA fueron agregados a los tubos de prueba. Los tubos de prueba usados para el análisis de la primera muestra fueron: el estándar, 4 tubos; el blanco, 4 tubos; la muestra, 4 tubos.

Los cambios en la absorbancia son resultado del tiempo, por eso es importante dejar reposar las muestras durante exactamente el mismo tiempo (2 minutos) antes de su lectura. Las pruebas fueron llevadas a temperatura ambiente.

Medición del estándar: 400 μ l del estándar de serina fue agregado al tubo de prueba (tiempo 0) que contenía 3 ml de la solución de OPA y es mezclado por 5 segundos. La mezcla se deja reposar durante 2 minutos antes de ser leída a 340 nm en el espectrofotómetro. 2 estándares fueron medidos antes de los blancos solos con los valores de la muestra.

Los últimos 2 estándares fueron medidos después de haber determinado todos los blancos y valores de las muestras. La media de estos estándares son usados para los cálculos. El valor típico de los estándares OD es cerca de 0.8.

Medición del blanco: Los blancos fueron preparados con 400 μ l de agua desionizada y tratados como se describió anteriormente. El valor típico del blanco OD es cerca 0.07.

Medición de la muestra: Las muestras fueron preparadas con 400 μ l de la muestra (Nielsen *et al.*, 2001).

5.7 Cuantificación de la proteína

5.7.1 Método de Lowry

- Se preparó una curva estándar a partir de albúmina bovina sérica (1 mg/ml).

Albúmina (µl)	0	10	20	40	60	80	100	150
Agua HPLC (µl)	200	190	180	160	140	120	100	50

- Se realizó una dilución de las muestras 1/40 (5 µl muestra + 195 µl agua HPLC)
- Se agregó a la curva y a las muestras 1 ml de la Solución C
- Se dejó reposar 15 minutos
- Se agregó 0.1 ml (100 µl) del Reactivo de Folin, diluido 1:1 con agua HPLC. Esto se preparó en el momento ya que es fotosensible.
- Se mezcló de 5 – 15 seg.
- Y se dejó reposar 45 min a temperatura ambiente
- Se leyó a 660 nm (Durante las primeras 5 horas de preparación).

Reactivo de Lowry

Preparación de las soluciones

Solución prestock: Disolver 4 g de NaOH + 30 g de Na₂CO₃. Aforar con agua destilada a 1 L (guardar a temperatura ambiente).

Tartrato de Sodio y Potasio 4% (wv): Disolver 4g de KNaC₄H₄O₆ · 4H₂O y aforar con agua destilada a 100 mL (guardar en refrigerador).

Sulfato cúprico 2% (wv): Disolver 2g de sulfato de cobre y aforar con agua destilada a 100mL (guardar a temperatura ambiente).

Solución Lowry A: Mezclar 1 ml de solución de tartrato de sodio y potasio + 1 ml de solución sulfato de cobre aforar con solución pre-stock a 100 ml. Nota: respetar el orden de adición de las soluciones para evitar formación de precipitados. La cantidad de nuestra a preparar es de acuerdo al número de muestras a procesar.

Solución Lowry B: Diluir Reactivo Folin 1:1 con agua HPLC. Calcular la cantidad a preparar según las muestras procesadas diarias. Esta solución se dura solo un día.

Solución Lowry C: Mezclar 1 ml de la Solución B + 50 ml de la Solución A. La cantidad de nuestra a preparar es de acuerdo al número de muestras a procesar.

5.8 Análisis electroforético por el método de Laemmli

El gel del análisis electroforético es del tipo SDS-PAGE (por sus siglas en inglés de Sodium dodecyl sulphate-polycrylamide gel electrophoresis) y fue desarrollado siguiendo el método de Laemmli. En donde muestras de los hidrolizados de proteínas fueron mezcladas en una dilución 1:1 (v/v) con agua. Las muestras que se utilizaron fueron las de los 0, 10, 20, 60, 90, 120 y 180 minutos de los hidrolizados. Una vez diluidas las alícuotas de la muestra de hidrolizados se mezcló 1:1 (v/v) con buffer 2x SDS para muestras y se hirieron durante 5 minutos antes de cargarse en el gel. El sistema de geles consistía en una concentración final del gel de acrilamida al 15%. El grosor total del gel era de 0.75 mm, con 8 cm de gel separador y 2 cm de gel concentrador. El gel se corrió a 200 V, 20 mA, 3 W y 15°C y una vez terminado el corrimiento, se le agregó la solución fijadora (25 % de isopropanol y 10 % de ácido acético) por un tiempo de 20 minutos. A continuación se enjuagó el gel de la solución fijadora y el gel fue teñido con azul

de Coomassie G-250 durante toda la noche y se destiñeron con ácido acético al 10 % (Ausubel, 2002).

5.9 Análisis electroforético por el método de tris-trisina

El gel del análisis electroforético es del tipo SDS-PAGE (por sus siglas en inglés de Sodium dodecyl sulphate-polycrylamide gel electrophoresis) y fue desarrollado siguiendo el método de tris-trisina. En donde muestras de los hidrolizados de proteínas fueron mezcladas en una dilución 1:1 (v/v) con agua. Las muestras que se utilizaron fueron las de los 0, 10, 20 60, 90, 120 y 180 minutos de los hidrolizados. Una vez diluidas las alícuotas de la muestra de hidrolizados se diluyó 1:1 (v/v) con buffer 2x Tricina para muestras y se calentaron de 30 a 60 minutos a 40 °C antes de cargarse en el gel. El sistema de geles consistía en una concentración final del gel de acrilamida al 18%. El grosor total del gel era de 0.75 mm, con 8 cm de gel separador y 2 cm de gel concentrador. El gel se corrió a 200 V, 20 mA, 3 W y 15°C y una vez terminado el corrimiento, se le agregó la solución fijadora (25 % de isopropanol y 10 % de ácido acético) por un tiempo de 20 minutos. A continuación se enjuagó el gel de la solución fijadora y el gel fue teñido con azul de Coomassie G-250 durante toda la noche y se destiñeron con ácido acético al 10 % (Ausubel, 2002).

5.10 Antioxidantes

La determinación de la capacidad antioxidante se realizó por el método descrito por Nenadis *et al.*, 2004, para determinar la capacidad antioxidante por el método de ABTS⁺.

Para la determinación por el método de ABTS⁺ se colocó el reactivo de ABTS⁺ 7mM con una solución de persulfato de potasio 2.45Mm, la mezcla se dejó en la obscuridad a temperatura ambiente por 16 h antes de su uso. La solución de ABTS⁺ se diluyó con un buffer de fosfato de sodio 0.1M a pH 7.4 a una absorbancia de 0.70+/-0.02 a 734 nm), se colocaron 20µL (1-16 mg/mL) de la muestra con 2 mL de solución diluida de ABTS⁺ y se leyó la absorbancia a 734 nm. Para realizar la curva estándar se colocó 20µL de diferentes concentraciones

de reactivo de Trolox (0-3 Mm) con 2 mL de la solución diluida de ABTS⁺. La capacidad antioxidante se expresa en equivalentes de trolox.

5.11 Diseño experimental

5.11.1 Para Suero de Leche

Se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado, comprendido por dos factores que fueron: concentración inicial de sustrato ($S_0 = 18.73, 38.45$ y 81.16 g/L) y concentración inicial de enzima ($E_0 = 1.58, 3.18$ y 6.36 AU/L). Se realizaron réplicas para cada combinación. La variable respuesta fue el grado de hidrólisis que se determinó durante 180 minutos. Mediante la esta variable respuesta se busco modelar matemáticamente con un modelo teórico el proceso del biorreactor. Los análisis estadísticos fueron hechos usando *S-Plus* 8.0.4, Insightful Corporation, Seattle, Washington, USA, y *JMP* 7.0.2, SAS Institute Inc.

5.11.2 Para Frijol Pinto Durango

Se tiene un biorreactor de membrana en el que se llevó a cabo un proceso de hidrólisis de proteínas de frijol, para el cual se contaron con factores como son el pH de la solución, presión del sistema, temperatura de la solución y el tamaño del poro de la membrana, también se cuenta con dos variables que son concentración del sustrato y concentración de la enzima, como variable respuesta se midió el grado de hidrólisis que presentan los hidrolizados, mediante esta variable respuesta se buscó modelar matemáticamente con un modelo teórico el proceso en el biorreactor.

En la Fig. 5.1 se muestra el esquema general del biorreactor y los puntos claves del proceso.

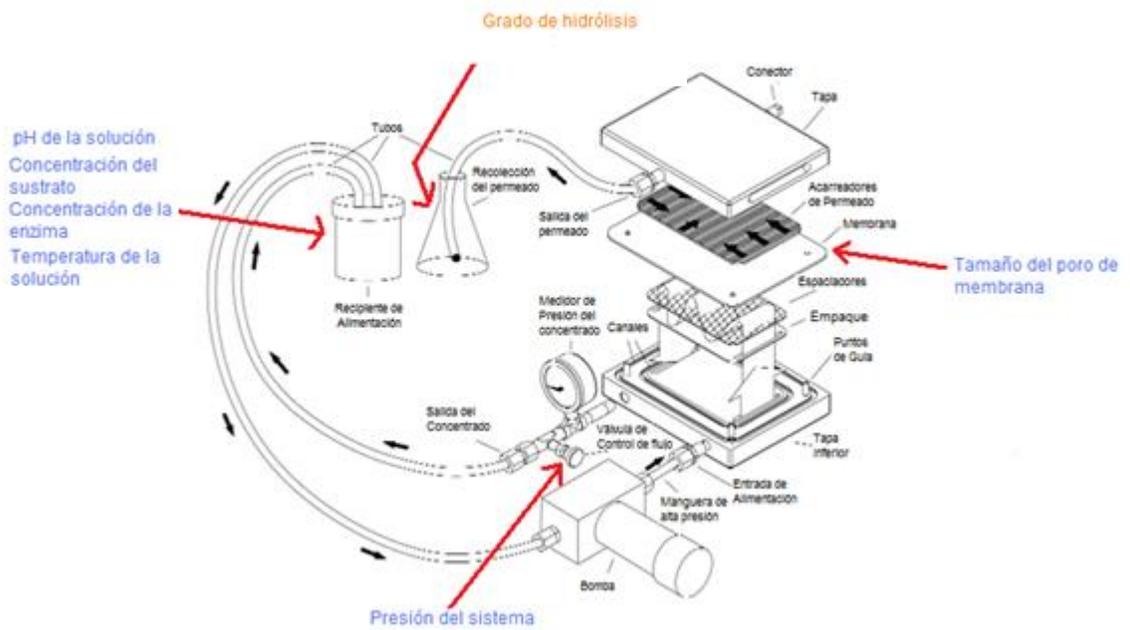


Fig. 5.1 Esquema general con los puntos clave de medición.
 Extraído del manual del SEPA CF II

6. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

6.1 Modelaje del grado de hidrólisis del suero de leche por regresión no lineal

Se ajustó el modelo propuesto por González-Tello *et al.* (1994) y por Wei y Zhimim (2006):

$$x = \left(\frac{1}{b}\right) \times \ln(1 + a \cdot b \cdot t) \quad (1)$$

en donde: x representa el grado de hidrólisis, t es el tiempo de la reacción, a y b los parámetros del modelo; x representa la solución analítica de la ecuación diferencial

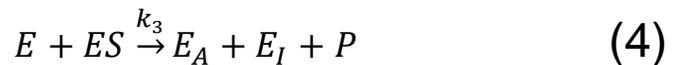
$$\frac{dx}{dt} = a \cdot \exp(-b \cdot x) \quad (2)$$

Note que a representa a la velocidad inicial de la reacción (en $x = 0$) y que $-b$ es una constante relacionada con la desaceleración de a durante el tiempo de hidrólisis.

Wei y Zhimin (2006) realizaron una descripción general del sistema de la reacción enzima-hidrólisis que se muestra a continuación:



En el mecanismo anterior pueden observarse juntas una inactivación enzimática y una inhibición por sustrato y/o por producto, de acuerdo con las expresiones (4) – (6), respectivamente.



Wei y Zhimin (2006) mostraron que el coeficiente a en la ecuación (1) o (2) cambia en relación con la concentración inicial de enzima (E_0) y con la concentración inicial de sustrato (S_0), esto concuerda con el mecanismo real que se desarrolla en un sistema de hidrólisis enzimática. De manera similar ellos mostraron que el coeficiente b está relacionado con S_0 , dependiendo de los mecanismos subyacentes.

Los parámetros a y b fueron estimados usando modelos de regresión no lineal para cada combinación de E_0/S_0 .

Los grados de hidrólisis obtenidos con diferentes concentraciones iniciales de enzima y diferentes concentraciones iniciales de sustrato se muestran en la Fig. 6.1.

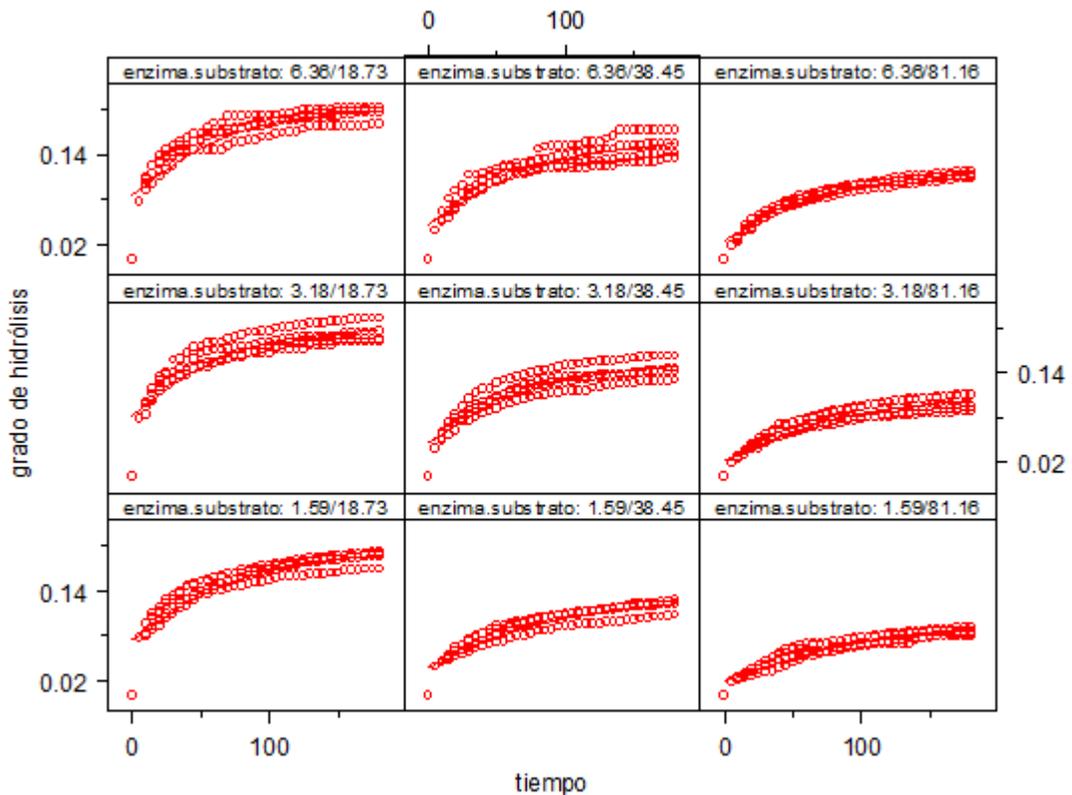


Fig. 6.1 Efectos de E_0/S_0 en las curvas de grados de hidrólisis de suero de leche con y sin precalentamiento, a 3 concentraciones de enzima y sustrato diferentes

En donde en se pueden apreciar los comportamientos de las curvas de los grados de hidrólisis a lo largo del tiempo, en donde es claro como las curvas del grado de hidrólisis muestran una desaceleración monótona relacionada directamente con E_0 / S_0 . Los parámetros estimados en (1) se muestran en el Cuadro 6.1.

Cuadro 6.1 Parámetros a y b estimados (error estándar) por regresión no lineal para las diferentes condiciones de hidrólisis

E_0 (mg/L)	S_0 (mg/L)	E_0/S_0	\hat{a}		\hat{b}	
6.36	18.73	0.33	.0497	(0.0061)	29.975	(0.964)
3.18	18.73	0.16	.0195	(0.0019)	28.483	(0.935)
6.36	38.45	0.16	.009	(0.0012)	26.637	(1.637)
1.59	18.73	0.08	.0068	(0.0007)	25.969	(1.422)
3.18	38.45	0.08	.0078	(0.0007)	27.998	(1.231)
6.36	81.16	0.08	.0044	(0.0003)	28.558	(1.124)
1.59	38.45	0.04	.0032	(0.0004)	29.617	(2.191)
3.18	81.16	0.04	.0028	(0.0003)	29.739	(2.189)
1.59	81.16	0.02	.0017	(0.0001)	31.555	(2.552)

S_0 Concentración inicial de sustrato
 E_0 Concentración inicial de enzima

Una relación lineal significativa entre \hat{a} y $E0/S0$ fue obtenida y se muestra en la Fig. 6.2.

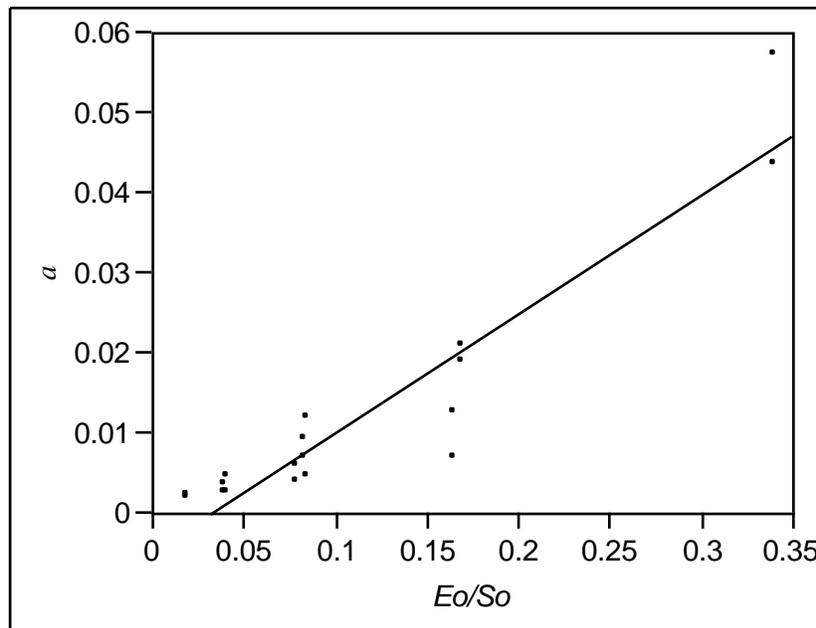


Fig. 6.2 Relación entre \hat{a} y $E0 / S0$

Y en la Fig. 6.3 se puede apreciar la relación entre \hat{b} y $S0$, donde se observa claramente que \hat{b} no se altera significativamente si se cambia $S0$. Este resultado muestra que en esta condición experimental, la reacción enzimática no está acompañada de una inhibición por producto o por sustrato.

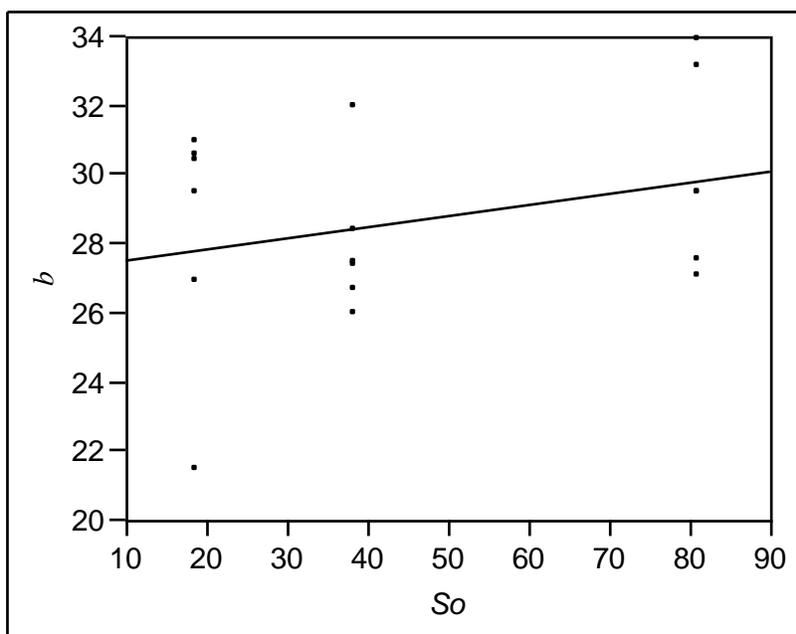


Fig. 6.3 Relación entre \hat{b} y S_0

En un diseño experimental general Wei y Zhimin (2006) mostraron que

$$a = k_2 \frac{E_0}{S_0} \quad (7)$$

Es decir, está directamente relacionada entre a y E_0/S_0 , y

$$b = \frac{k_3 K_m}{k_2} \quad (8)$$

Es decir, b es una constante independiente de los valores de E_0 o S_0 , cuando el mecanismo (3) no está acompañado por ninguno de los mecanismos descritos en (5) o (6). Estos resultados contradicen a González-Tello et al. (1994), en donde menciona la presencia de un inhibidor de las serino proteinasas en las

proteínas de suero de leche. Por lo tanto ellos propusieron una versión modificada de la ecuación (1) en la que incorporaron un tercer parámetro que representa la inhibición por sustrato. Sin embargo, el proceso de estimación estadística (resultados no mostrados) de este modelo no convergen usando nuestros datos experimentales, lo que indica que la incorporación del parámetro de inhibición por sustrato en el modelo no es necesario (Bates y Watts, 1988). Por otra parte, Sousa et al. (2004) estudiaron el sistema de proteínas de suero de leche usando alcalasa, concluyendo que la cinética con alcalasa no se comporta como una relación típica de Michaelis - Menten debido a la presencia de una inhibición competitiva por productos. Ellos usaron la ecuación

$$v = \frac{V_{max}[S_0]}{K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S_0]} \quad (9)$$

donde v denota la velocidad inicial de reacción, y K_I es un parámetro de inhibición. Ellos calcularon a diferentes pH el parámetro K_I , en particular, se estima $K_I = 1,2$ a un pH de 8. Sin embargo, el buen ajuste de la ecuación (9) con sus datos no se debatió en profundidad, presentando sólo la relación de Lineweaver - Burk con tres puntos como datos y un pH de 10. Además, a pH 8, la ecuación (9) muestra una falta de ajuste en sus datos. De manera similar, Tardioli *et al.* (2005) reportaron el uso de una modificación en la relación tipo Michaelis - Menten, pero sólo muestran evidencias de ajuste de sus modelos en el caso de pH = 9.5.

Para nuestros datos, las constantes cinéticas estimadas se obtuvieron usando las ecuaciones (7) y (8), y se muestran en el Cuadro 6.2.

Cuadro 6.2. Valores de las constantes cinéticas estimadas para hidrólisis de proteínas de suero de leche usando alcalasa

k_2	$k_d = k_3 K_m$
0.1515	4.129

La estimación de K_m no está clara para nuestro sistema experimental, juzgando a partir de la Fig. 6.4 en la cual se graficó $1/\hat{a}$ vs. $1/S_0$, apunta a un significado no claro de la constante de disociación en este sistema enzimático (Cornish-Bowden, 1995). Galvao *et al.* (2009) usando quimotripsina a 55 ° C y pH 8 para hidrolizar proteínas de suero de leche, demostró que la pseudo hipótesis de estado - constante (la tasa de cambio del sustrato es cero a lo largo de su hidrólisis) asumidas por la relación Michaelis - Menten no era adecuada para esta reacción.

Wei y Zhimin (2006) estudiaron un sistema de BSA-tripsina y encontraron un comportamiento experimental que no corresponde a una cinética tradicional de Michaelis - Menten. A pesar de su hallazgo, estos autores estimaron K_m tomando los datos de acuerdo con una cinética de Michaelis - Menten, que nosotros consideramos como engañosa. Barros y Malcata (2004) utilizando cardosin A para hidrolizar proteínas de suero de leche, utilizaron ecuaciones tipo Michaelis - Menten para estimar las constantes de disociación, a pesar de la falta de ajuste de los modelos estimados.

En base a nuestros resultados experimentales, se propone una definición poco clara de K_m debido a la pobre evidencia sobre la cinética de Michaelis - Menten en nuestro sistema enzimático.

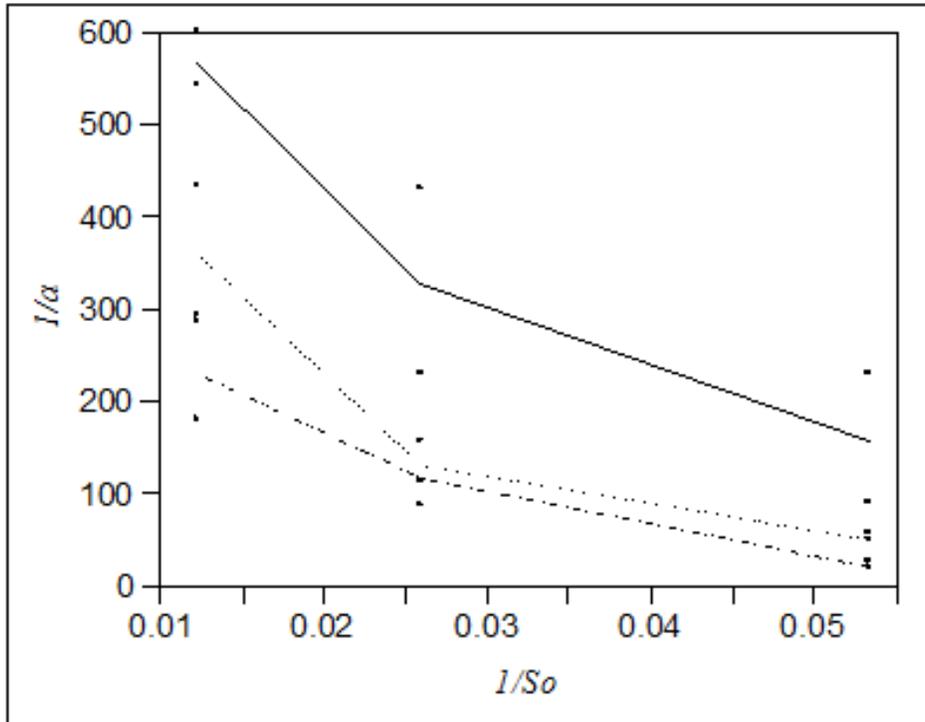


Fig. 6.4 Relación entre $1/\hat{\alpha}$ y $1/S_0$

Línea continua $E_0= 1.59$, línea punteada $E_0= 3.18$, línea con puntos diagonales $E_0= 6.36$

Un claro patrón es observado en la Fig. 6.5, como sugiere la ecuación (1), donde el grado de los grados de hidrólisis son los mismos para S_0 pero los valores varían para E_0 siguiendo aproximadamente una relación, confirmando la desactivación enzimática de segundo orden. El orden de la reacción de inactivación enzimática fue mostrada por González Tello *et. al* (1994) como una reacción de segundo orden.

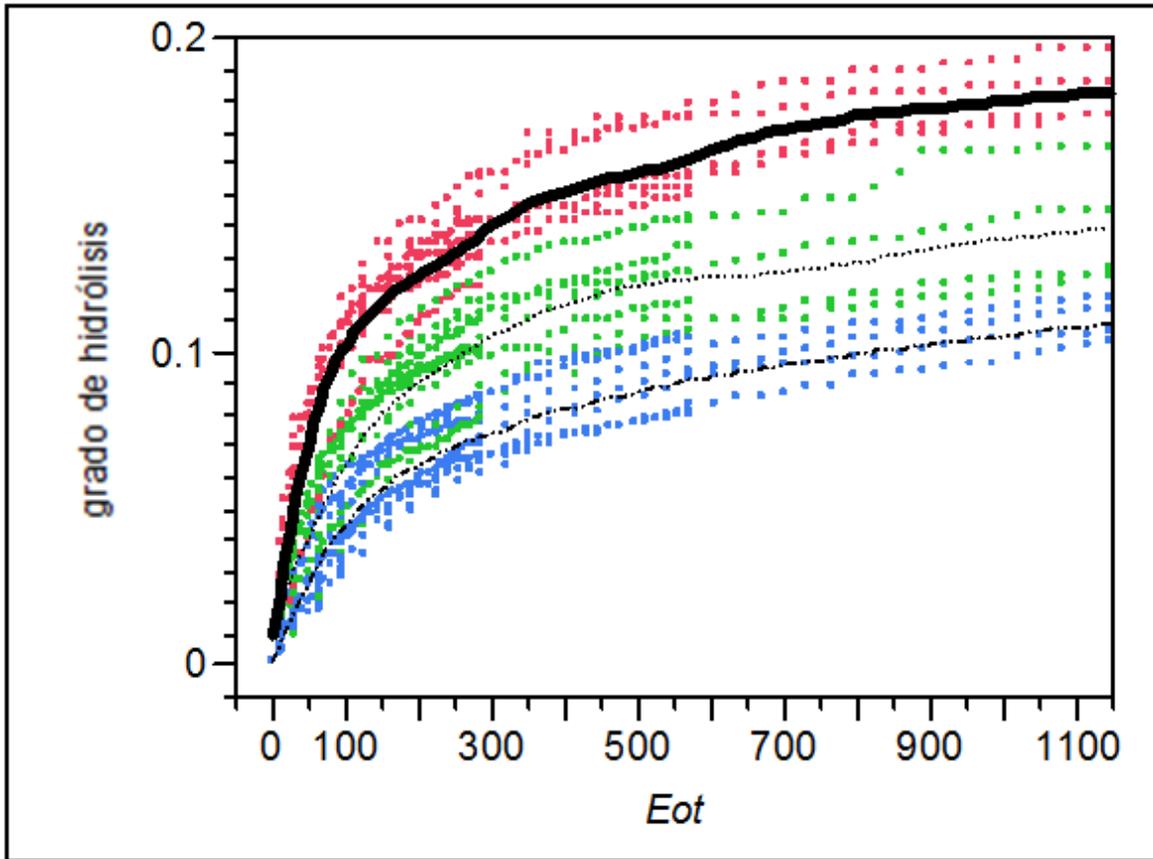


Fig. 6.5 Relación entre E_0t y el grado de hidrólisis

Línea continua $S_0 = 18.73$, línea punteada $S_0 = 38.45$, línea punteada diagonal $S_0 = 81.16$

6.2 Grado de hidrólisis en Frijol Pinto Durango

6.2.1 Grado de hidrólisis en biorreactor tipo lote

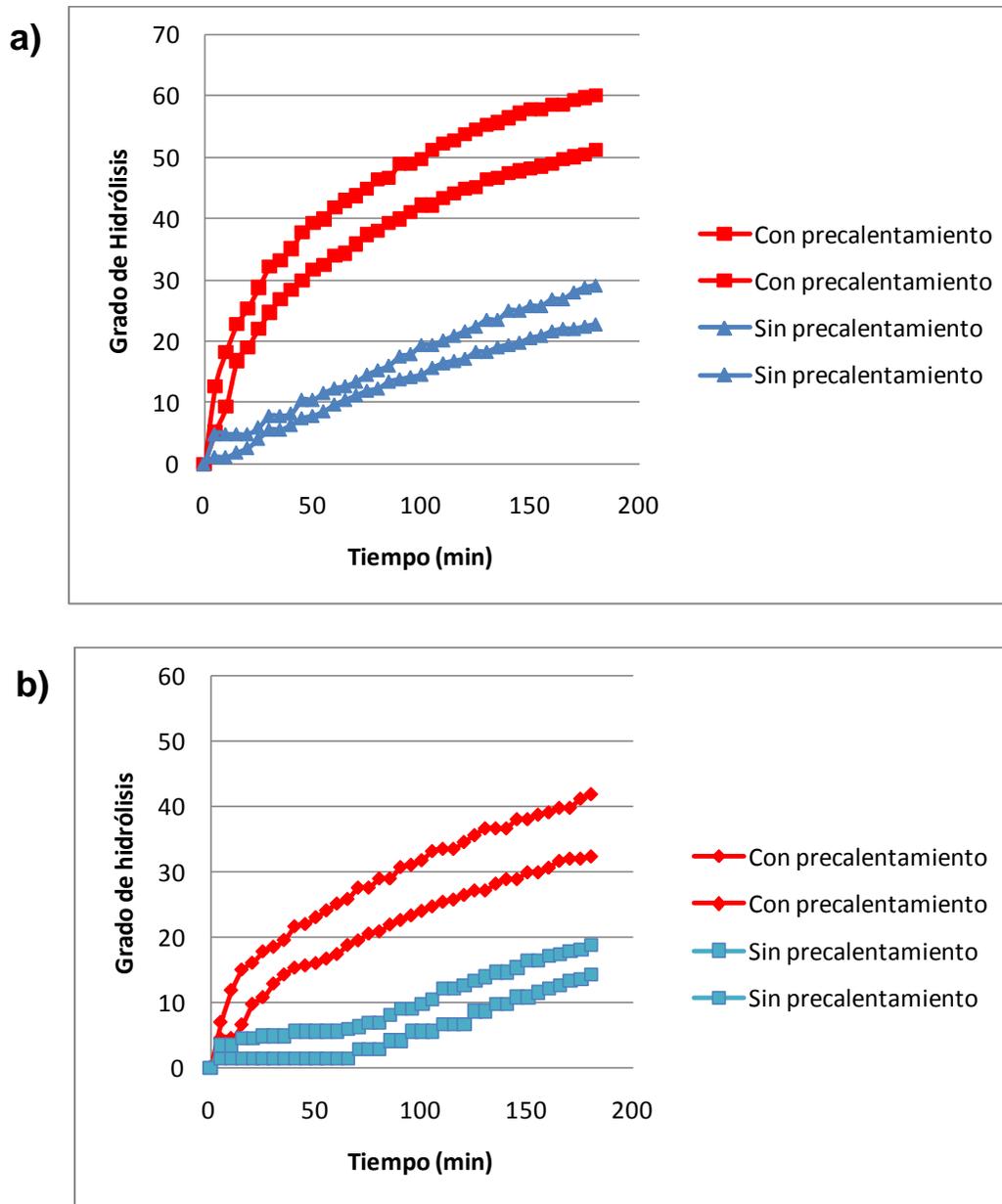
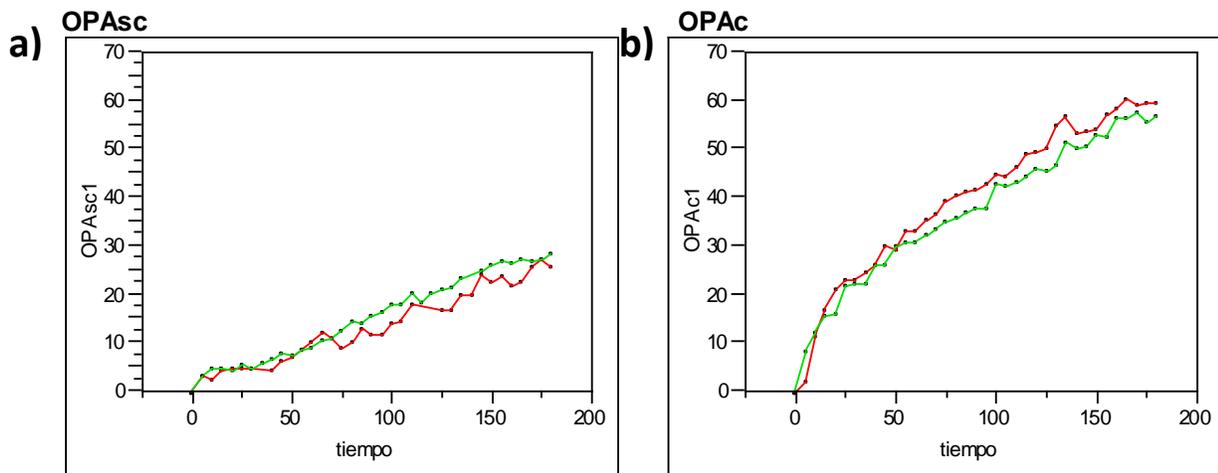


Fig. 6.6 Grado de hidrólisis de la proteína de frijol utilizando dos concentraciones de enzima inicial a) 18.36 AU/L y b) 13.77 AU/L, con y sin precalentamiento, método pH estado

De acuerdo a estos resultados se identificó como mejor opción E0 como 18.36 AU/L a ser utilizada en todo el trabajo restante. Por otra parte, se observa que el grado de hidrólisis se ve incrementado cuando se le aplica precalentamiento a la solución que se va a hidrolizar, obteniéndose casi el doble del grado de hidrólisis comparado con los hidrolizados que no fueron precalentados. También se observa que la evolución de la curva ocurre de una manera más lineal sin precalentamiento, y que la hidrólisis con precalentamiento muestra una velocidad inicial de reacción más alta.

6.2.2 Grado de hidrólisis en biorreactor tipo membrana

Debido a que el método pH estado no es compatible con la operación continua del biorreactor con membrana tipo placa, ya que el permeado es separado y no permanece todo junto como en el caso del biorreactor tipo lote; es necesario utilizar un método alternativo de medición del grado de hidrólisis; el método OPA como alternativa, fue comparado con el método pH estado en un biorreactor tipo lote.



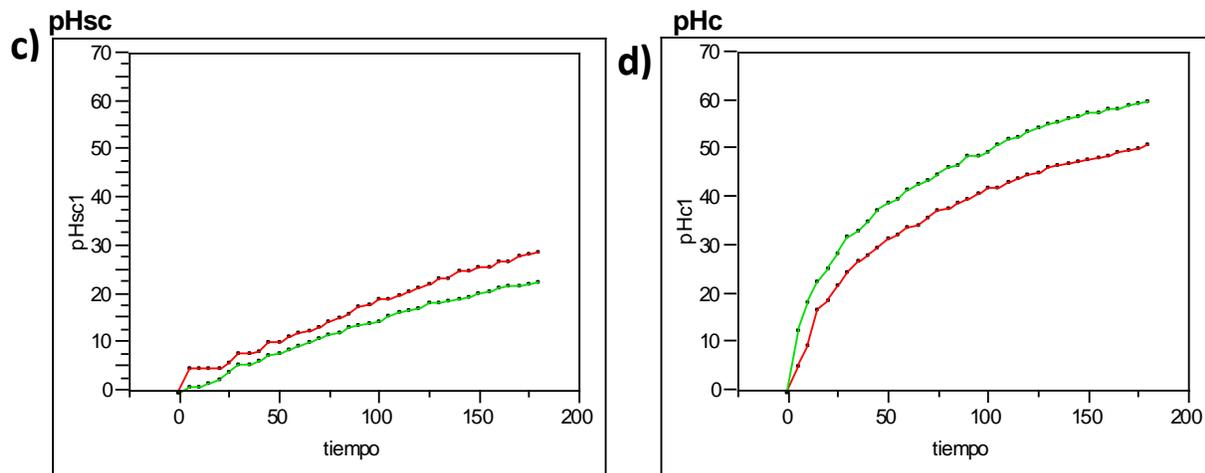


Fig. 6.7 Gráficas para comparar grados de hidrólisis, pH estado versus OPA con y sin calentamiento en un biorreactor tipo lote en hidrolizados de frijol común de la variedad Pinto Durango

De la Fig. 6.7 podemos ver las gráficas en a) para el método OPA del tratamiento sin calentamiento, y en b) con calentamiento, y en c) el método pH estado en el tratamiento sin calentamiento y en d) con calentamiento; en las cuales se puede apreciar que con el método de pH estado existe una mayor diferencia entre réplicas, mientras que con el método de OPA esta dispersión es mucho menor, por lo que para las condiciones experimentales de este trabajo se considera que los valores de OPA son más reproducibles en comparación con los obtenidos por el método de pH estado.

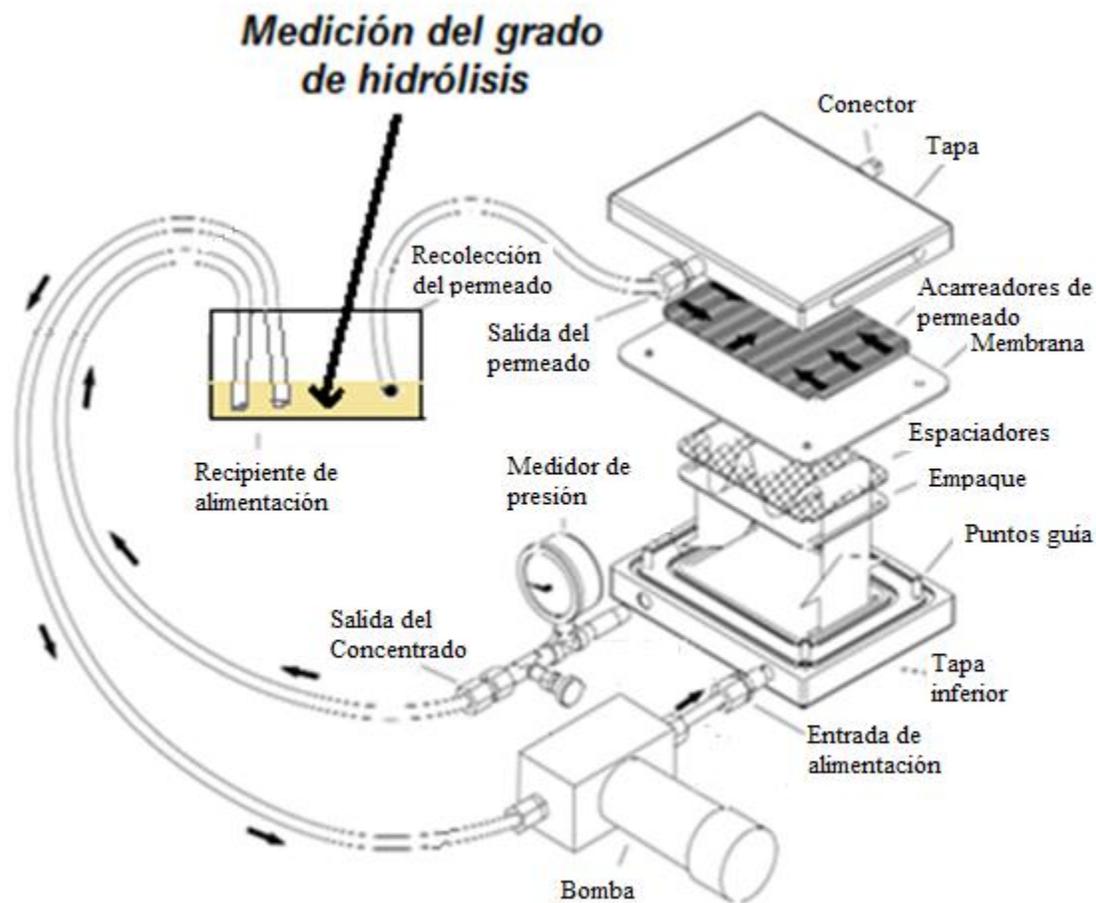
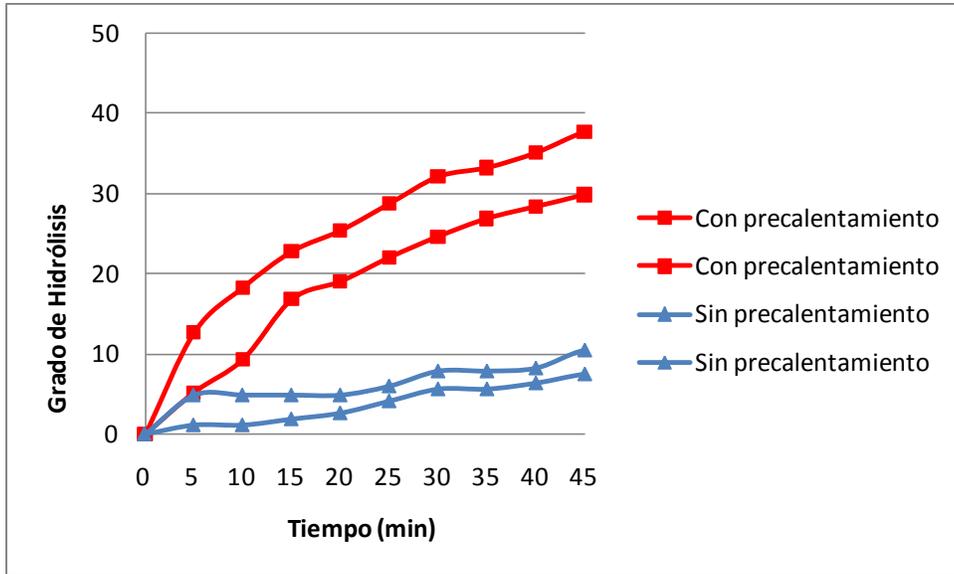


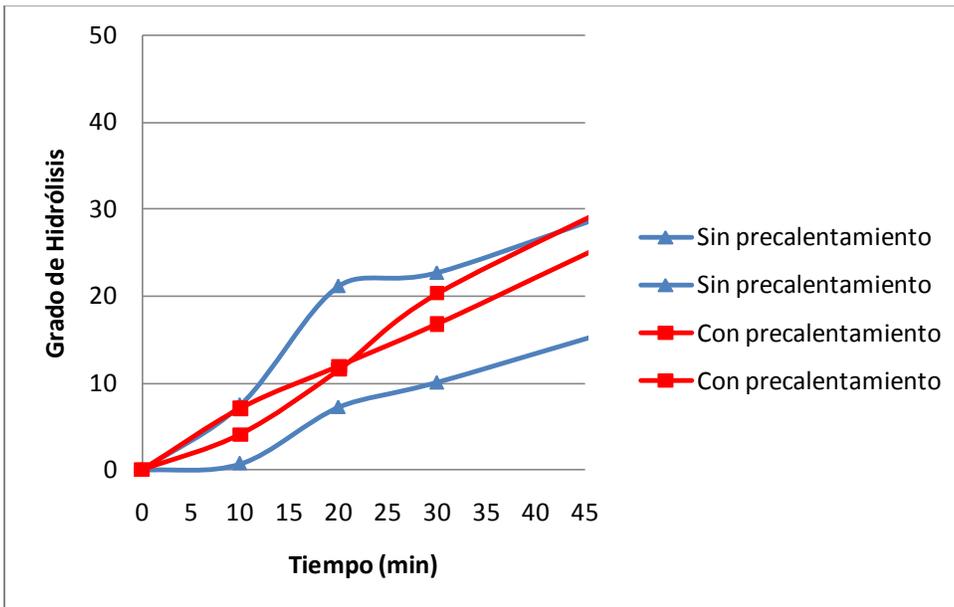
Fig. 6.8 Diagrama de la recirculación en el biorreactor de membrana

Utilizando el biorreactor de operación continua se consideró una variante de operación en la que en lugar de retirar el permeado de manera continua (por 45 minutos), se recirculó en el equipo durante 180 minutos, esto es un tipo de operación parecida a la operación en lote, con el objetivo de observar el efecto sobre el grado de hidrólisis como consecuencia del aumento del tiempo de contacto enzima – substrato, y observar potencialmente una mayor productividad. En la Fig. 6.8 se muestra la disposición física del equipo en la recirculación.

a)



b)



c)

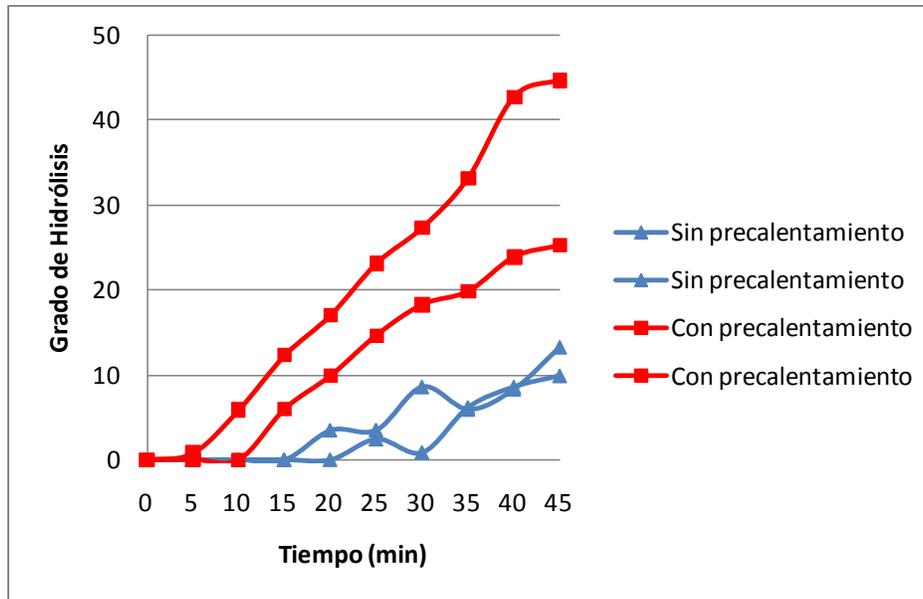


Fig. 6.9 Comparación de grado de hidrólisis por lote y por operación continua, considerando efectos de precalentamiento y de recirculación sobre la proteína de frijol común de la variedad Pinto Durango, en donde en a) es la hidrólisis en biorreactor tipo lote y en b) hidrólisis por operación continua con recirculación y c) hidrólisis por operación continua sin recirculación

En la Fig. 6.9 se puede apreciar la comparación entre el grado de hidrólisis por lote y por operación continua con y sin recirculación, con y sin precalentamiento de los primeros 45 minutos de la hidrólisis, en las cuales observamos que en la hidrólisis por operación continua sin recirculación y con precalentamiento, se tiene un grado de hidrólisis equiparable al generado en lote a diferencia de la hidrólisis de suero de leche, en el caso del frijol Pinto Durango el precalentamiento sí tiene un efecto importante, con excepción de la operación continua con recirculación. También se puede apreciar que en el caso de el biorreactor de membrana sin recirculación al principio de la hidrólisis tarda algunos minutos en levantar el grado de hidrólisis, esto puede ser debido a que en estos tratamientos las muestras a las cuales se les hace el OPA se toman directamente del permeado y en los primeros minutos al parecer no hay paso de péptidos a través de la membrana y sólo pasa agua. Hay que notar también que el caso del

biorreactor continuo a 45 minutos, la curva de hidrólisis muestra un comportamiento con potencial de crecimiento, es decir que la curva respectiva no muestra saturación de la reacción; esto pudiera ser importante en una operación continua en la práctica real en donde se reúse la enzima a partir de volver a alimentar con sustrato el sistema experimental.

Al parecer la razón por la cual el efecto del precalentamiento afecta más al frijol que al suero de leche radica en el tipo de proteínas existentes en cada una; ya que si bien es claro que calentando las proteínas se logra una desnaturalización que puede provocar que se incremente el grado de hidrólisis debido a que es más fácil llegar a los grupos ahora expuestos de la proteína debido al desdoblamiento sufrido por el calor, pero también es importante mencionar que cada una de las proteínas necesita diferente temperatura para lograr la desnaturalización; en este caso las proteínas contenidas en el suero de leche que en su mayoría son β - lactoglobulinas, α - lactoalbúminas, suero de albúmina bovino e inmoglobulinas, que alcanzan su desnaturalización irreversible a los 78, 62, 64 y 72 °C, respectivamente (Fox & McSweeney, 2003), que son temperaturas no tan elevadas y que pueden llegarse a alcanzar en el proceso en por el cual se obtiene el suero de leche, es por eso que se puede pensar que el suero de leche con el que se trabajó en este proyecto ya tenía desnaturalizadas sus proteínas y es por esta razón no se notó ningún cambio significativo de la utilización del precalentamiento o no en los diferentes tratamientos; ahora bien, en el caso de las proteínas del frijol los principales componentes son las globulinas y albuminas y éstas necesitan temperaturas de 93.4 y 89.4 °C respectivamente (Gallegos Tintoré *et al.*, 2004), que son temperaturas relativamente altas y difíciles de alcanzar en el proceso de extracción de las proteínas; es debido a esto que dado que no habían sufrido proceso térmico alguno previo, las proteínas de frijol con las que se trabajó no estaban desnaturalizadas y es por eso que al aplicarles el calor suficiente en el precalentamiento (95°C por 15 min.) logramos la desnaturalización de las mismas y se obtuvieron los resultados positivos mostrados.

6.3 Modelaje del grado de hidrólisis de concentrado de proteínas de frijol Pinto Durango

De igual forma que en suero de leche, se ajustó el modelo la ecuación (1) propuesto por González-Tello *et al.* 1994. Se estimaron los parámetros a y b mediante modelos de regresión no lineal, para cada concentración de sustrato y de enzima, así como para el precalentamiento o no, recirculación o no del permeado; los valores estimados se muestran en el cuadro 6.2.

Cuadro 6.3 Parámetros a y b estimados por regresión no lineal para las diferentes condiciones

Tratamiento	\hat{a}	\hat{b}	Lower CL a	Upper CL a	Lower CL b	Upper CL b
Lote con precalentamiento	1.720643789	0.057080477	1.43562	2.00567	0.05127	0.06289
Lote con precalentamiento	2.961977115	0.057356746	2.4967	3.42726	0.05289	0.06182
Lote sin precalentamiento	0.251396263	0.028747444	0.19135	0.31144	0.00992	0.04757
Lote sin precalentamiento	0.185676926	0.029071402	0.16334	0.20801	0.01707	0.04107
Membrana con recirculación con precalentamiento	0.588246138	0.009604095	0.45024	0.72625	0.0024	0.0168
Membrana con recirculación con precalentamiento	0.797565795	0.015090674	-0.0255	1.62067	-0.014	0.04418
Membrana con recirculación sin precalentamiento	0.357519928	0.016594401	-0.178	0.893	-0.0599	0.09311

Membrana con recirculación sin precalentamiento	1.420535697	0.055215091	-0.2758	3.11686	0.00335	0.10708
Membrana sin recirculación con precalentamiento	0.454174209	-0.021378104	0.01045	0.8979	-0.1171	0.07437
Membrana sin recirculación con precalentamiento	0.76151563	-0.014003541	0.41279	1.11024	-0.0401	0.01208
Membrana sin recirculación sin precalentamiento	0.073227768	-0.287952794	-0.0268	0.17331	-0.7693	0.19342
Membrana sin recirculación sin precalentamiento	0.113325045	-0.176327582	-0.0106	0.23721	-0.4519	0.09922

Los ajustes al modelo mencionado fueron satisfactorios estadísticamente únicamente para los tratamientos realizados por medio del biorreactor tipo lote y medianamente satisfactorios para los tratamientos en biorreactor de membrana con recirculación, mientras que los tratamientos realizados en el biorreactor de membrana sin recirculación fueron los que mostraron los resultados menos satisfactorios debido a su inicio lento en el grado de hidrólisis seguido de un comportamiento aproximadamente lineal hasta los 45 minutos, haciendo innecesario al parámetro b de la ecuación (1). En general se deben buscar otro tipo de modelos para las curvas de hidrólisis obtenidos en equipos con posibilidades de separación continua de permeados, ya que las curvas de grados de hidrólisis muestran no sólo la interacción enzima – sustrato, sino especificidades del equipo en particular.

6.4 Identificación del perfil de los péptidos mediante un análisis electroforético unidimensional de frijol Pinto Durango

6.4.1 En biorreactor tipo lote

En el gel del análisis electroforético de la Fig. 6.10 se puede observar en la parte baja de los gels la aparición de bandas que son los péptidos que se generaron a lo largo de la hidrólisis, y al comparar los gels con y sin precalentamiento los patrones de bandeado debidos a péptidos producto de la hidrólisis, son similares; esto debido a que todo está mezclado. Sobre las proteínas en suero de leche derivado de un proceso de fabricación no debe haber mayor impacto de un segundo tratamiento térmico.

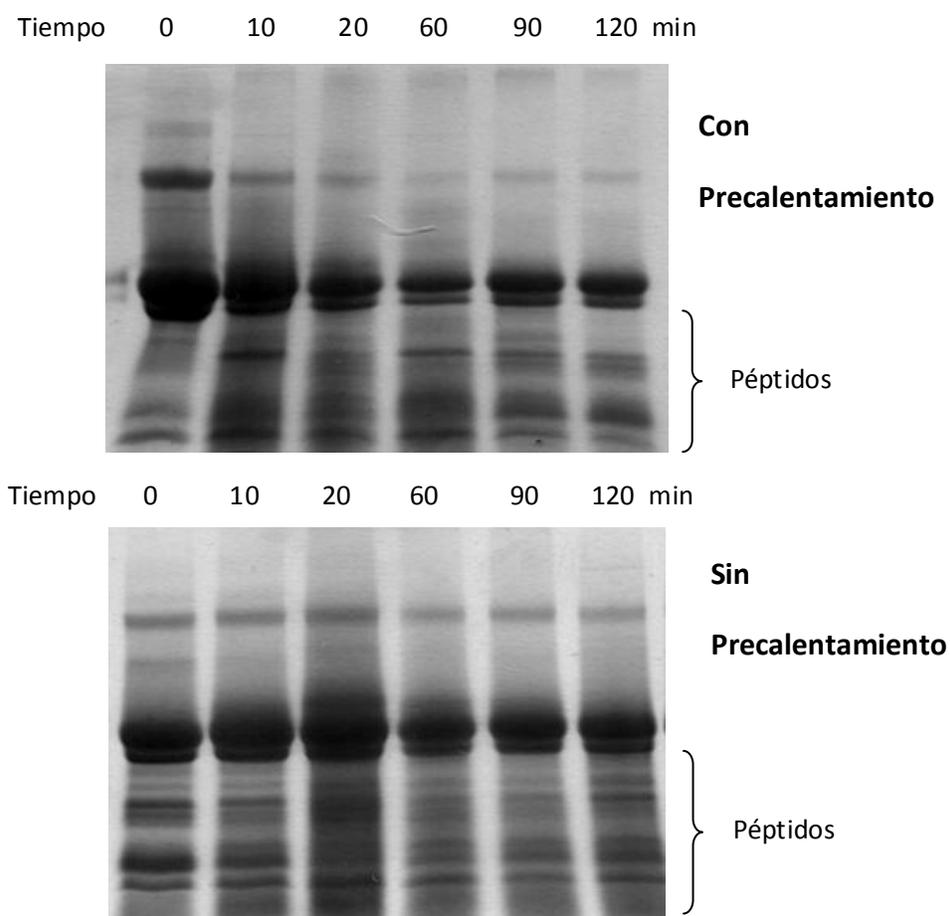
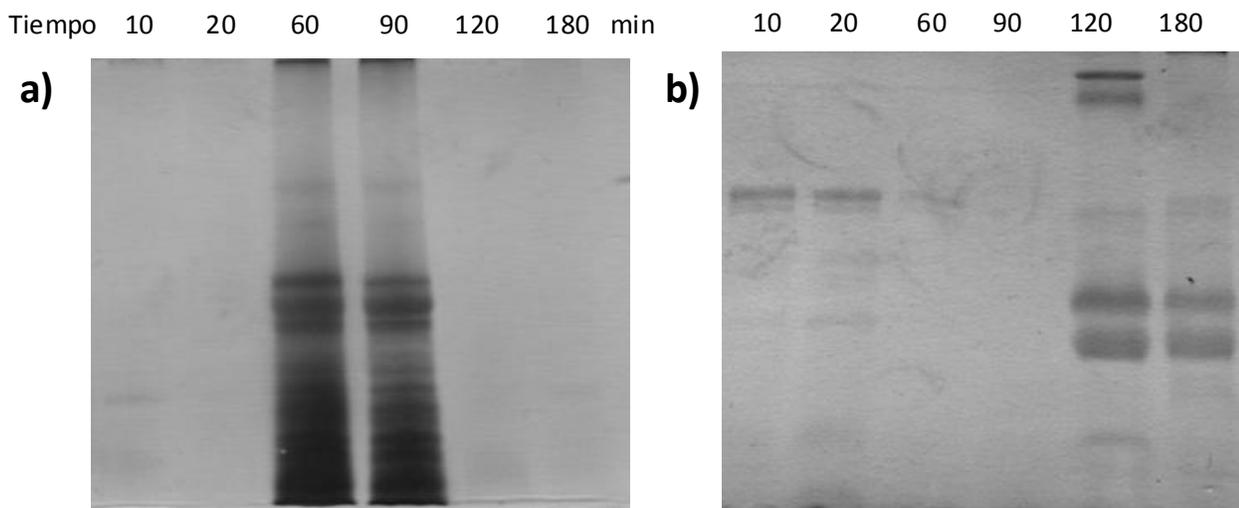


Fig. 6.10 Análisis electroforético SDS-Page con y sin precalentamiento de proteínas y péptidos de frijol Pinto Durango en biorreactor tipo lote

6.4.2 En biorreactor de membrana

En los geles del análisis electroforético mostrados en la Fig. 6.11 se puede observar en el caso del gel de electroforesis del biorreactor de membrana con recirculación y con precalentamiento que en los primeros minutos los péptidos pudieran estar solubilizados y debido a esto no se observan las bandas, además con precalentamiento se aprecian péptidos a tiempos menores al compararlos con el caso de sin precalentamiento, reduciendo a la mitad los tiempos de aparición de péptidos en el caso del precalentamiento; esta consistencia en las bandas puede deberse a que están más disponibles los enlaces de la proteína para la hidrólisis y debido a esto el corte es constante a lo largo del tiempo, mientras que en el caso de que no se precalentaron las proteínas éstas tienen una forma que impide que se alcancen fácilmente los enlaces internos de la estructura proteica, y es hasta después de algún tiempo de recirculación es que la enzima logra tener acceso a estos enlaces internos, con bandas de bajo peso molecular más concentradas en los mayores tiempos; en el caso de los geles sin recirculación el efecto del precalentamiento antes mencionado es aún más evidente. De hecho sin recirculación y sin precalentamiento no hay bandeo evidente.



Tiempo 0 15 30 45 0 15 30 45 min

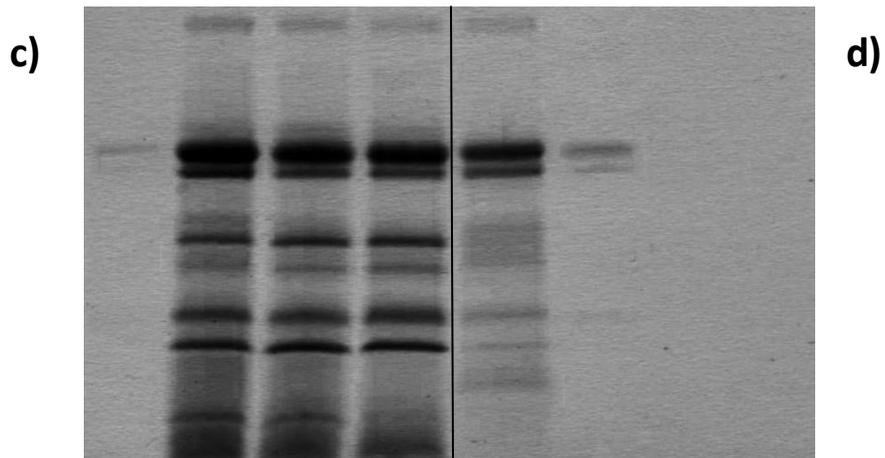
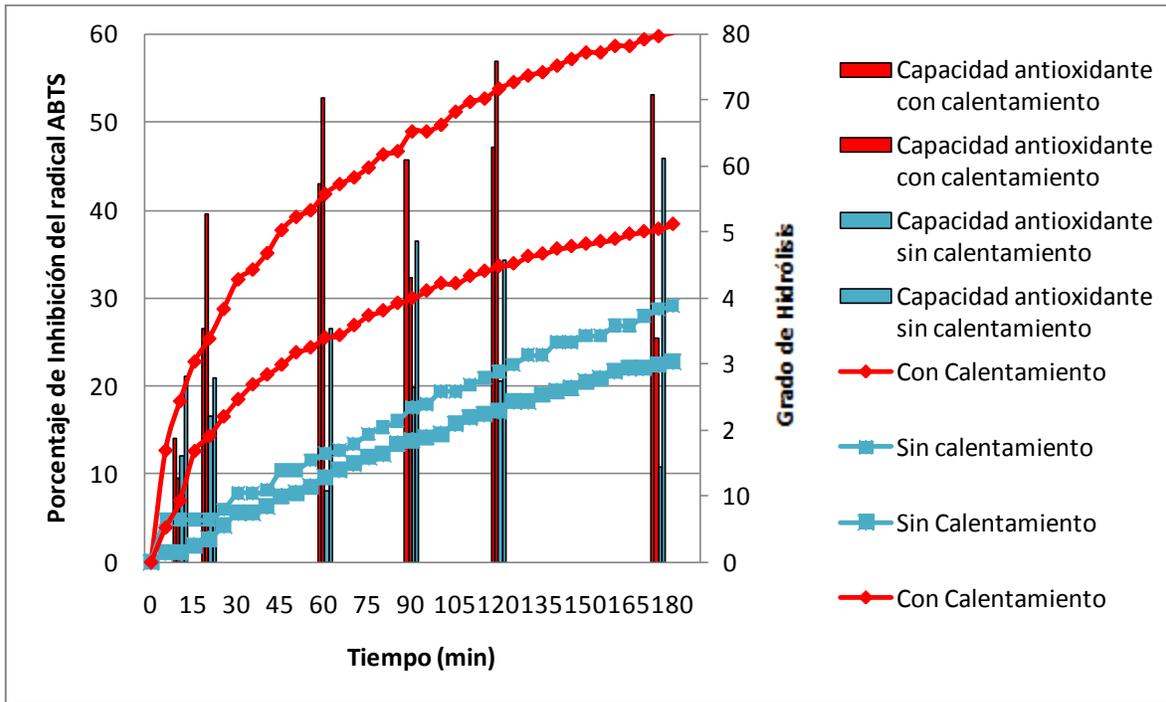


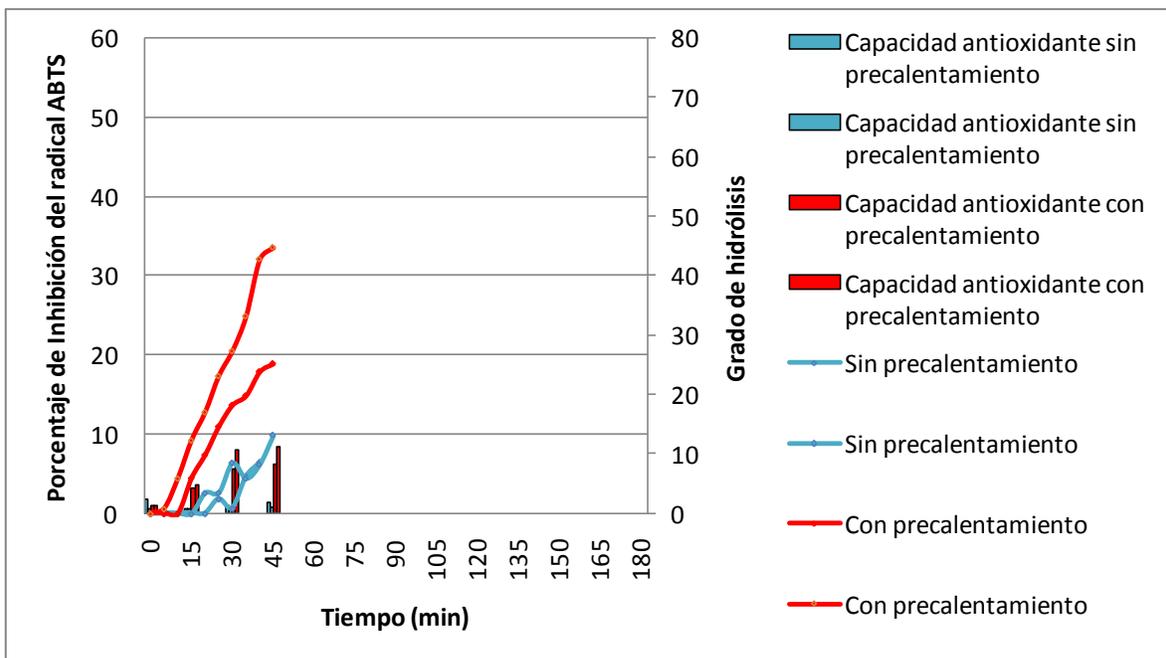
Fig. 6.11 Análisis electroforético SDS-Page de proteínas y péptidos de frijol Pinto Durango en biorreactor de membrana (a) con recirculación con precalentamiento (b) con recirculación sin precalentamiento, (c) sin recirculación con precalentamiento, (d) sin recirculación y sin precalentamiento

6.5 Evaluación de la capacidad antioxidante

a)



b)



c)

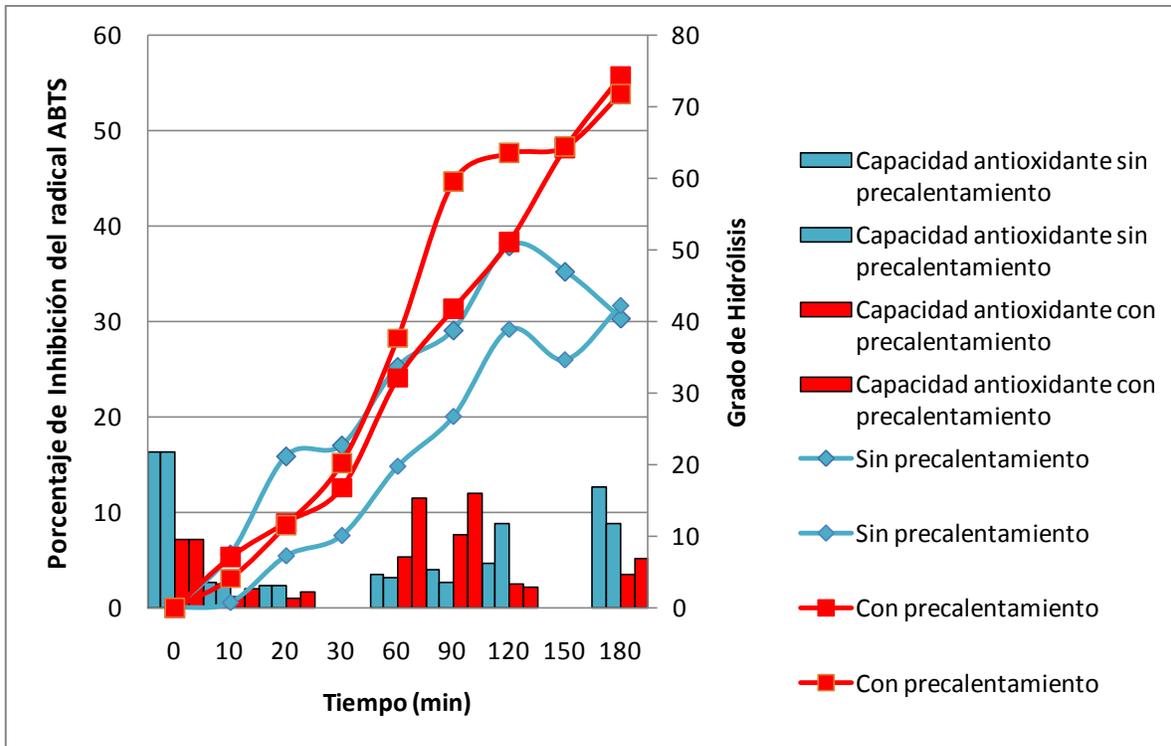


Fig. 6.13 Porcentaje de inhibición del radical ABTS por péptidos de proteínas de frijol en biorreactor tipo lote (a) y tipo membrana sin (b) y con (c) recirculación

En la Fig. 6.13 se muestran las gráficas del porcentaje de inhibición del radical ABTS en los diferentes tratamientos, en donde al parecer se muestra un porcentaje de inhibición mayor en el biorreactor tipo lote (55%) comparado con el biorreactor de membrana con recirculación del permeado (18%). En el caso del tratamiento sin recirculación el precalentamiento muestra un efecto importante sobre la capacidad antioxidante comparando con el mismo tratamiento pero sin precalentamiento. También es importante observar que existe efecto antioxidante desde el tiempo 0, en donde se encuentra todavía entera la proteína nativa del frijol; se puede pensar que en el biorreactor tipo lote, su mayor porcentaje de actividad antioxidante se debe a que se encuentran mezcladas las proteínas nativas con los hidrolizados.

6.5.1 Comparación de efectos sobre la capacidad antioxidante de las condiciones y del tiempo de hidrólisis

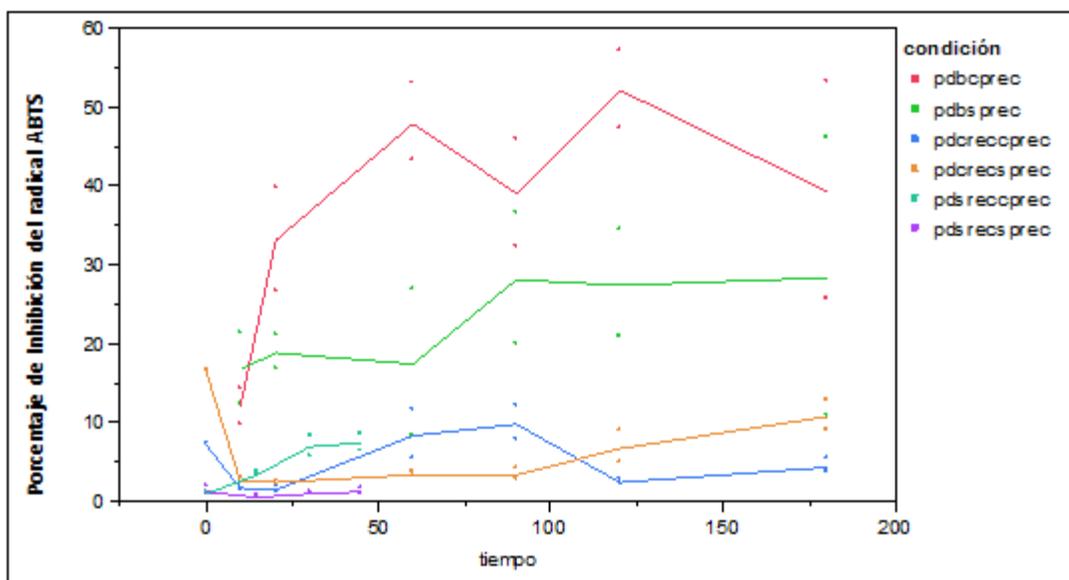


Fig. 6.14 Actividad antioxidante de los péptidos de frijol producidos a diferentes tiempos y condiciones de hidrólisis

En donde pdsreccprec: pinto durango sin recirculación con precalentamiento, pdsreccsprec: pinto durango sin recirculación sin precalentamiento, pdreccprec: pinto durango con recirculación con precalentamiento, pdreccsprec: pinto durango con recirculación sin precalentamiento, pdbcprec: pinto durango biorreactor tipo lote con precalentamiento y pdsbprec: pinto durango biorreactor tipo lote sin precalentamiento

En la Fig. 6.14 se observa que los hidrolizados obtenidos por el biorreactor de lote con precalentamiento muestran un nivel mayor de actividad antioxidante comparado con el resto de los tratamientos, siguiendo los hidrolizados obtenidos por el biorreactor de lote sin precalentamiento; los efectos de los péptidos obtenidos por medio del biorreactor de membrana muestran capacidades antioxidantes bajas relativamente. En las demás condiciones no se aprecian cambios estadísticamente significativos al paso del tiempo de la hidrólisis. En general, la determinación de inhibición de capacidad oxidante mediante la prueba ABTS arrojó resultados con baja reproducibilidad en este contexto experimental.

Las interpretaciones de mayor claridad son que los hidrolizados producidos bajo las diversas condiciones de hidrólisis sí muestran poder antioxidante ABTS, que son más efectivos cuando fueron producidos en lote tradicional, y que el poder antioxidante no cambió significativamente con el tiempo de hidrólisis.

7. CONCLUSIONES

Para suero de leche:

Para las curvas de hidrólisis con suero de leche y enzima alcalasa a diferentes concentraciones iniciales de sustrato y diferentes concentraciones iniciales de enzima no se identificó ninguna relación con el modelo de Michaelis-Menten.

El mecanismo de reacción enzimática no incluye inhibición debido al sustrato o al producto, en contraste con resultados publicados previamente; la inactivación enzimática fue confirmada como una de segundo orden.

Las correspondientes constantes cinéticas fueron estimadas.

Para frijol Pinto Durango:

Se utilizaron dos concentraciones iniciales de enzima y se identificó como mejor opción E0 como 18.36 AU/L a ser utilizada en todo el trabajo.

Se observó que con el precalentamiento se obtiene casi el doble del grado de hidrólisis comparado con los que no fueron precalentados.

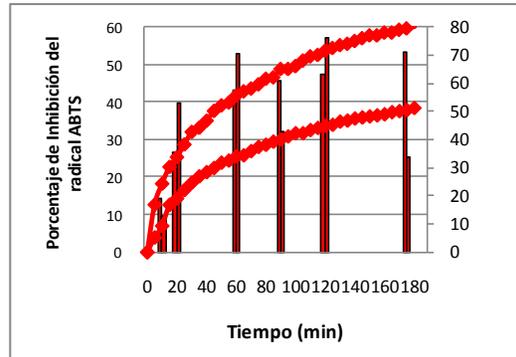
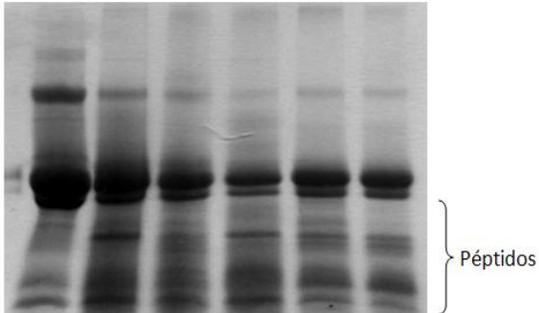
El grado de hidrólisis obtenido por operación continua sin recirculación y con precalentamiento, es equiparable al generado en lote.

Se encontró que el modelo utilizado solo se ajustó a los tratamientos realizados por medio del biorreactor tipo lote y sólo fueron medianamente satisfactorios para los tratamientos en biorreactor de membrana con recirculación.

BIORREACTOR TIPO LOTE

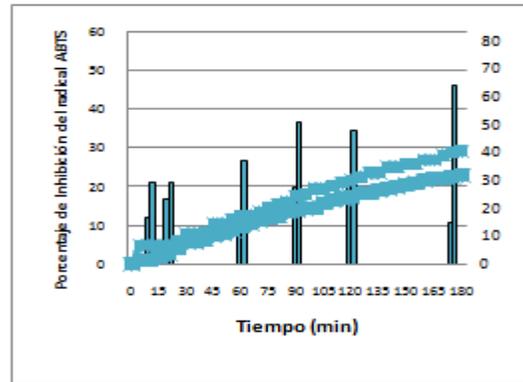
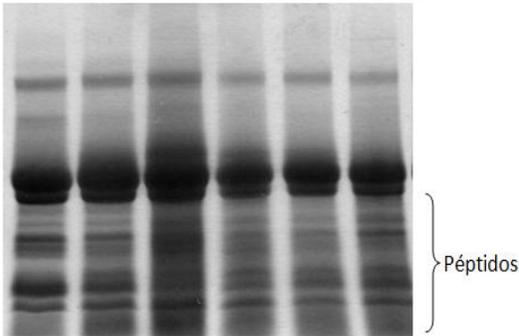
Con precalentamiento

Tiempo 0 10 20 60 90 120 min



Sin precalentamiento

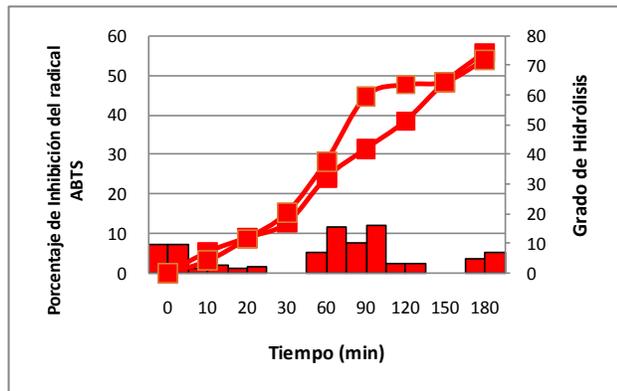
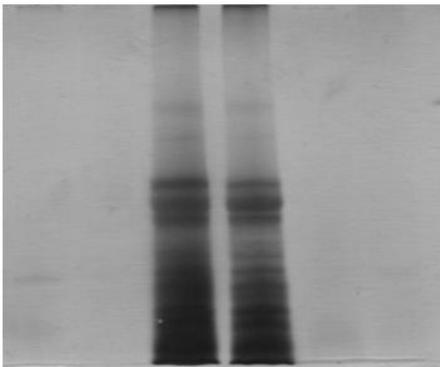
Tiempo 0 10 20 60 90 120 min



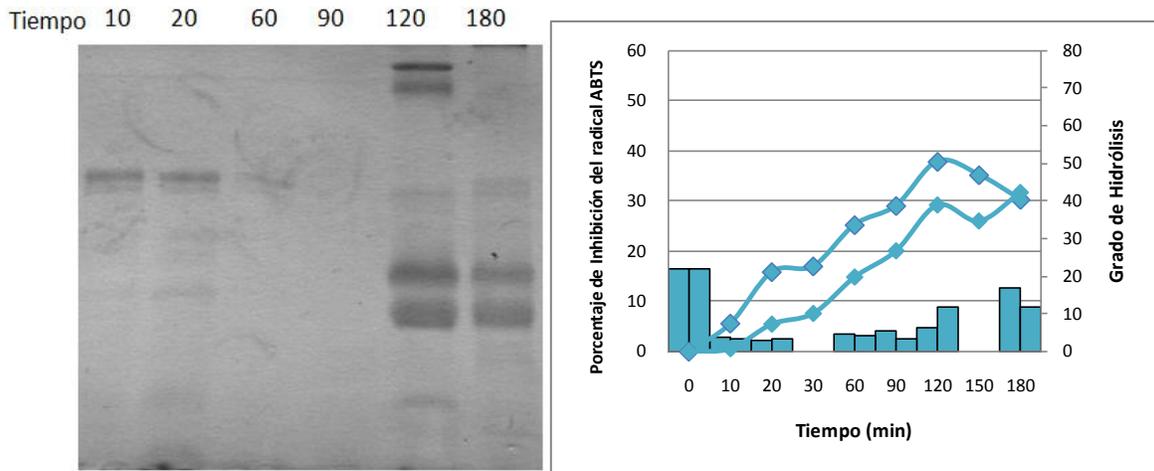
BIORREACTOR DE MEMBRANA

Con recirculación y con precalentamiento

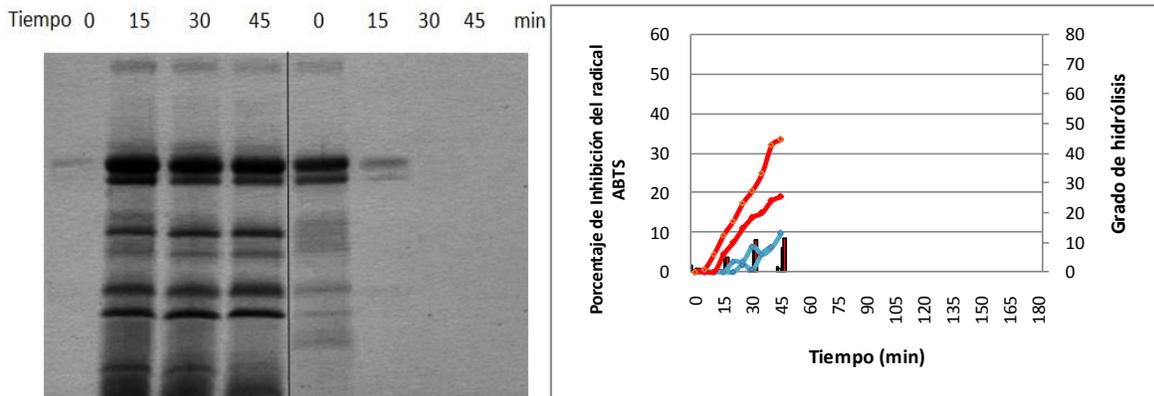
Tiempo 10 20 60 90 120 180 min



Con recirculación y sin precalentamiento



Sin recirculación con y sin precalentamiento



Los análisis electroforéticos mostraron la aparición de las bandas de los péptidos como producto de la hidrólisis.

Los análisis de capacidad antioxidante mostraron que la proteína nativa es la que genera capacidad antioxidante y no los péptidos, por lo que los productos de la hidrólisis no son relevantes en cuanto a capacidad antioxidante.

En general:

El efecto del precalentamiento sólo es evidente si las proteínas con las que se va a trabajar no han recibido tratamientos térmicos previos.

El biorreactor tipo lote es fácil de instalar y fácil de manejar, tiene las ventajas de una muy fácil limpieza y que no se necesitan soluciones específicas

para su limpieza; tiene las desventajas de que los péptidos y las enzimas se encuentran siempre en el mismo recipiente, incluso al terminar la hidrólisis, por lo que es necesario desactivar las enzimas al finalizar el proceso, lo que constituye en un gasto adicional por el hecho de que las enzimas ya no pueden volver a ser utilizadas, además es necesario realizar una filtración adicional para poder separar los péptidos.

El biorreactor de membrana por otro lado tiene una complicación media para ser instalado, sin embargo es fácil de manejar una vez que la persona se haya familiarizado un poco con el equipo, tiene la ventajas de que los péptidos se van separando debido a la membrana que forma parte del equipo, además de que la membrana es intercambiable y se ajusta a las necesidades del proyecto, además las enzimas al no poder pasar a través de la membrana, pueden volver a utilizarse una vez terminado el proceso, necesitando únicamente que se le agregue un sustrato nuevo para volver a trabajar, lo cual puede reducir los costos en la compra de enzima; la principal desventaja de este equipo es la necesidad de la limpieza constante de la membrana para su óptima funcionalidad, ya que este proceso es tardado (4 hrs. aprox.) y necesita de la preparación de diversas soluciones para su limpieza; la ventaja es que las soluciones son fáciles de preparar y son soluciones cotidianas en los laboratorios y son fáciles de conseguir.

El biorreactor de membrana tiene un futuro prometedor en la industria debido a que se pueden obtener hidrolizados de manera constante una vez que se tenga estabilizado el equipo; respecto al modelo matemático – estadístico se tendría que buscar la forma de modelar el sistema de tal forma que se adapte a las necesidades específicas del equipo.

Respecto al trabajo experimental del laboratorio, faltaría realizar más pruebas de operación continua con el biorreactor de membrana suministrando de forma continua sustrato, para ver cuál es la calidad de los péptidos generados y observar si se puede mantener una producción continua de los péptidos. Además de utilizar diferentes presiones en el sistema, para observar si de esta forma se obtienen más / mejores hidrolizados.

8. BIBLIOGRAFÍA

Ausubel, F. B. (2002). *Short Protocols in Molecular Biology, fifth edition, volume 1*. USA: Wiley.

Baek, H., & Cadwallader, K. (1995). Enzymatic Hydrolysis of Crayfish Processing by-products. *Journal of Food Science* 60(5) , 929-935.

Baró L., J. J.-F. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica*; 42:3-4 , 135-145.

Barona, B. (2007). *Ultrafiltration as enzymatic membrane bioreactor*.

Barros R M & Malcata F X (2004) A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, Vol. 88, 351-359.

Bates DM & Watts DG (1988) *Nonlinear Regression Analysis and Its Applications*. John Wiley & Sons.

Belhocine, D., Mokrane, H., Grib, H., Loounici, H., Paus, A., & Mameri, N. (2000). Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor. *Chemical Engineering Journal* , 189-196.

Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 42 (2) , 227-236.

Camacho, F., Gonzalez-Tello, P., Páez-Dueñas, M. P., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2001). Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *The journal of Dairy Research*. 68 [2] , 251-265.

Campbell, K., & Glatz, C. (2009). Mechanisms of Aqueous Extraction of Soybean Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 10904–10912.

Carrillo Aguado, J. L. (2006). Tratamiento y reutilización del suero de leche. *Mundo Lácteo y Cárnico* , 27-30.

Chacón-Villalobos, A. (2006). Tecnologías de membranas en la agroindustria láctea. *Agronomía Mesoamericana* 17(2) , 243-264.

Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S. (2006). Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor: I. Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis. *Journal of Membrane Science* , 45-56.

Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S. (2006). Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor II. Characterisation for the fate of the enzyme by multivariate data analysis. *Journal of Membrane Science* 286 , 322-332.

Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S. (2007). Use of response surface methodology to potimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. *Journal of Food Engineering* 80 , 1134-1145.

Cheison, S. C., Zhang, S., & Xu, S. (2009). Comparison of a modified spectrophotometric and the pH-stat methods for determination of the degree of hydrolysis of whey protein hydrolysed in a tangential-flow filter membrane reactor. *Food Research International* 42 , 91-97.

Cornish-Bowden A. (1995). *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. Portlan Press.

Fox, P., & McSweeney, P. (2003). *Advanced dairy chemistry-1 Proteins*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

Gallegos Tintoré, S., Pacheco A., J., Betancur A., D., & Chel G., L. (2004). Extracción y caracterización de las fracciones protepinicas solubles del grano de Phaseolus lunatus L. *Archivos latinoamericanos de nutrición* , 81-88.

Ghosh, R. (2009). Ultrafiltration-Based Protein Bioseparation. En *Handbook of Membrane Separation* (págs. 498-499). LLC: Taylor & Francis Group.

González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P., & Guadix, E. M. (1994). Enzymatic Hydrolysis of Whey Proteins: I. Kinetic Models. *Biotechnology and Bioengineering, Vol 44* , 523-528.

Guadix Escobar, A. M. (2001). *Producción en reactores de membrana de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral*. Granada: Tesis doctoral. Editorial de la Universidad de Granada.

Lora Sánchez, Ana María (2007). *Identificación y cuantificación de dos proteínas con propiedades antimicrobianas presentes en suero lacteo*, Tesis de Maestría, Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Mannheim, A., & Cheryan, M. (1990). Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *Journal of Food Science* 55(2) , 381-390.

Matemática, I. (s.f.). *Universidad EAFIT*. Recuperado el 21 de Agosto de 2009, de <http://ingenieria-matematica.eafit.edu.co/recursos/glosario/m.html>

Mathews, C. K., van Holde, K., & Ahern, K. (2002). *Bioquímica*. Madrid: Pearson Educación, S.A.

Mendiburu Díaz, H. (Enero de 2000). *Alfinal*. Recuperado el 21 de Agosto de 2009, de <http://www.alfinal.com/Temas/reactoresquimicos.shtml>

Montoya, C. a., Lallés, J.-P., & Leterme, P. (2010). Phaseolin diversity as a possible strategy to improve the nutritional value of common beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International* 43 , 443-449.

Montoya, C., Gomez, A., Lalles, J., & Souffrant, W. (2008). In vitro and in vivo protein hydrolysis of beans (*Phaseolus vulgaris*) genetically modified to express different phaseolin types. *Food Chemistry* 106 , 1225-1233.

Morales-de León, J. C., Vázquez-Mata, N., Torres, N., Gil-Zenteno, L., & Bressani, R. (2007). Preparation and Characterization of Protein Isolate from Fresh and Hardened Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of food Science Vol. 72 No. 2* , 96-102.

Muñoz de Chávez, M. (1999). *Tablas de valor nutritivo de los alimentos*. México, D.F.: Pax México.

Muzquiz, M., Burbano, C., Ayet, G., Mercedes, M., & Cuadrado, C. (1999). The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*, Environmental and varietal differences. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 3 , 210-216.

Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS Assay. *Agricultural and food chemistry* , 4669-4674.

Nielsen, P. M., & Olsen, H. S. (2002). Chapter 6: Enzymic Modification of food protein. En *Enzymes in food technology*. UK: Sheffield Academic Press.

Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science Vol. 66, No. 5* , 642-646.

Oseguera Toledo, M. E., (2009), Actividad antioxidante y anti-inflamatoria de hidrolizados de proteína de dos variedades de frijol común, Tesis de maestría, Maestría en Ciencia y Tecnología de los alimentos (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Panda, T., Naidu, G., & Sinha, J. (1999). Multiresponse analysis of microbiological parameters affecting the production of pectolytic enzymes by *Aspergillus niger*: a statistical view. *Process Biochemistry* 35(1-2) , 187-195.

Paredes Lopez, O., Guevara Lara, F., & Bello Perez, L. A. (2006). *Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas*. Mexico: FCE, SEP, CONACYT, CAB.

Pearce, J. (2005). Aislado de proteína de trigo en aplicaciones para la industria cárnica. *Mundo lácteo y cárnico, enero/febrero* , 17-20.

Pineda Alonso, D., Salucci, M., Lázaro, R., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición* , 104-11.

Prieto Velazco, C. A. (2007). *Diseño y Optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas*. Granada, España: Editorial de la Universidad de Granada.

Prieto, C. A., Guadix, A., Gonzalez-Tello, P., & Guadix, E. M. (2007). A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. *Journal of Food Engineering* , 257-265.

Prieto, C., Guadix, E., & Guadix, A. (2009). Optimal Operation Of a Protein Hydrolysis Reactor with Enzyme Recycle. *Journal of Food Engineering* .

Rodríguez-Nogales, J., Ortega, N., Perez-Mateos, M., & Busto, M. (2007). Experimental design and response surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088. *Food Chemistry* 101 , 634-642.

Santalla, M., Fueyo, M., Rodino, P., Montero, I., & Ron, M. (1999). Breeding for culinary and nutritional quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in intercropping system with maiza (*Zea mays* L.). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 3 , 225-229.

Seung-Goo, L., & Hak-Sung, K. (1993). Optimal Operating Policy of the Ultrafiltration Membrane Bioreactor for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Biotechnology and Bioengineering, Vol. 42* , 737-746.

Sousa Jr R, Lopes G, Tardioli P, Giordano R, Almeida P & Giordano R. (2004) Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 21, no.2, 147-153.

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., & FitzGerald, R. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal* 13, 447-453.

Tardioli P W, Sousa Jr R, Giordano R C & Giordano R L C (2005) Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by alcalase immobilized on 10% glyoxyl – agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 36, 555-564.

Trusek-Holownia, A. (2008). Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal* 39, 221-229.

Whitaker, J. (1977). Enzymatic modification of proteins applicable to foods. En R. Feeney, & J. Whitaker, *Food proteins: Improvement through chemical and enzymatic modifications (Vol. 160)*. Washington, DC: American Chemical Society.

Whitaker, J. (2003). Enzyme-Catalyzed Reactions. En J. Whitaker, A. Voragen, & D. Wong, *Handbook of food enzymology* (pág. Capítulo 4). New York: Marcel Dekker, Inc.

Yeboah, F. K., Alli, I., Simpson, B. K., Konishi, Y., & Gibbs, B. F. (1999). Tryptic fragments of phaseolin from protein isolates of Phaseolus beans. *Food Chemistry* 67, 105-112.

9. ANEXOS

9.1 Limpieza del biorreactor

Una vez terminada cada prueba en el biorreactor era necesario seguir un protocolo de limpieza para aumentar la vida útil de la membrana, el protocolo fue el siguiente:

1. Nota: Para estar seguro de que el proceso de limpieza es bueno para el tipo de membrana que se esté usando hay que checar la compatibilidad de las soluciones y el pH con el material de la membrana.
2. Llene el tanque con agua tibia (35-45 °C) y recircule por 20 o 30 minutos.
3. Deseche el agua y repita el paso 2 por lo menos una vez.
4. Llene el tanque con una de las siguientes soluciones: 0.5 % NaOH ó KOH y recircule por 20-30 minutos.
5. Deseche las soluciones de limpieza.
6. Repita el paso 2 y el paso 3.
7. Llene el tanque con una de las siguientes soluciones: 0.1 N HCl ó 0.5 % HNO₃.
8. Recircule por 20-30 minutos.
9. Deseche la solución.
10. Repita el paso 2 y el paso 3.
11. Llene el tanque con una solución de 0.5 % NaOH + 0.5 % EDTA y recircule por 20-30 minutos.
12. Deseche las soluciones limpiadoras.
13. Repita los pasos 2 y 3.

14. Desinfecte con una de las siguientes soluciones: 0.5-1 % de Formaldehído al 40 %, 0.35 % H₂O₂ ó 200 ppm Hipoclorito de Sodio.

15. Deje con una de las siguientes soluciones: 0.1 % de Azida de Sodio ó 1.5 % de formaldehído.

16. Nota: Si la membrana no está limpia, los siguientes tratamientos pueden ser considerados:

(1). Volver a realizar todo el procedimiento desde el paso 1 al 16.

(2). Aplicar soluciones de enzimas, alguna de las siguientes puede ser seleccionada: 1 % de Pepsina, 1 % Tripsina/Quimotripsina, 1 % Pancreatina, Tera-A-Zyma.

Favor de ajustar el pH de la enzima de acuerdo con la temperatura óptima de acción y recircule por 20-30 minutos, entonces deje toda la noche, al siguiente día repita los pasos del 1 al 15.

(3) Por favor pregunte si usted tiene alguna pregunta.

(4) Este protocolo está abierto para cualquier mejora siempre y cuando no sea contraproducente.

Dr. Lech Ozimek
Director of Alberta Dairy Associate Research Unit
Associate professor
Dept. of Agr. Food & Nutr. Science
4-10 Agriculture/Forestry Center
University of Alberta
Edmonton AB T6G2P5
Canadá