

Lej. 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Química

Trabajo monográfico de actualización
Estudio de Hidrolizados Proteínicos con aplicación en
Alimentos

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

P R E S E N T A:

ROBERTO CARMONA DIAZ CORTES



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE.

I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	2
III. CONDICIONES DE HIDROLISIS	
3.1. MÉTODOS DE HIDRÓLISIS	4
3.2. FACTORES INVOLUCRADOS EN EL PROCESO DE HIDROLISIS	12
3.3. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE HIDRÓLISIS.....	16
3.4. ESPECIFICIDAD ENZIMÁTICA	17
3.5. CONSIDERACIONES IMPORTANTES PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDRÓLISIS	19
IV. ENZIMAS CON APLICACIÓN EN HIDRÓLISIS	
4.1. COMO ACTÚAN LAS ENZIMAS.....	20
4.2. QUE SON LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	25
4.3. COMO SE CLASIFICAN LAS PROTEASAS	27
4.4. CONDICIONES DE ACCIÓN ENZIMÁTICA	28
4.5. ENZIMAS ESPECÍFICAS	35
V. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS	
5.1. CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	41
5.2. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS	42
5.3. TIPOS DE HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS	43

5.4.	CONDICIONES DE HIDRÓLISIS	45
5.5.	MÉTODOS ANALÍTICOS DE CUANTEO DE AMINOÁCIDOS.....	51
VI.	USOS DE LOS HIDROLIZADOS PROTEÍNICOS.....	
6.1.	USOS ACTUALES DE LOS HIDROLIZADOS	52
6.2.	USOS POTENCIALES DE LOS HIDROLIZADOS	62
6.3.	ALMACENAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE HIDROLIZADOS PRO- TEÍNICOS	64
VII.	CONCLUSIONES	67
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	69

INTRODUCCION

El crecimiento actual de la población exige una mayor producción de alimentos, es por esto que todas las fuentes posibles pretenden ser explotadas al máximo para lograr incrementar tanto su cantidad como su calidad.

Dentro de los productos alimenticios, las proteínas son las más cotizadas por su valor nutricional así como por su función en todos los organismos. El presente trabajo está enfocado a la producción de hidrolizados proteínicos con aplicación en alimentos, ya que éstos tienen un gran número de usos y pueden obtenerse de fuentes diversas.

Los hidrolizados proteínicos se emplean para incrementar el valor nutritivo de productos de consumo común ó como saborizantes, por esto la obtención de hidrolizados para todas estas aplicaciones es cada vez más importante.

Los hidrolizados proteínicos, dependiendo de su origen y métodos de obtención presentan propiedades muy diversas, tomando en cuenta que la proteína de la que deriven tendrá que sufrir cambios químicos específicos y las vías para obtenerlos tendrán también un papel fundamental en cuanto a las características finales del producto.

Actualmente los hidrolizados proteínicos se obtienen principalmente por dos métodos: los químicos que emplean ácidos en caliente y los enzimáticos que requieren condiciones más específicas y controladas. Este trabajo está enfocado a describir los métodos viables de obtención considerando los más específicos y eficientes y con aplicaciones más amplias dependiendo de las necesidades.

GENERALIDADES

Los hidrolizados proteínicos se emplean como aderezos para un sinnúmero de alimentos ya que existe una variedad muy amplia y las características y peculiaridades de cada uno de éstos aderezos los hace muy cotizados comercialmente.

Si se toma esto en consideración, es de esperarse que los hidrolizados tengan una importancia comercial muy grande ya que cada vez son más usados y tienden a conquistar más mercados, pero además los hidrolizados son fuentes alimenticias importantes.

Dado que las proteínas son básicas en la alimentación, los hidrolizados que de éstas se obtengan podrán enriquecer un variado grupo de comestibles que tienen un bajo o nulo contenido proteínico o beneficiar al producto proteínico en consideración, mejorando sus cualidades organolépticas y nutritivas ya que éstos por la forma en que se consumen favorecen la asimilación a nivel intestinal lo que recae en una nutrición más completa, además una diversidad de productos contienen una gran cantidad de proteína, como son la carne, huevo, pescado, leche, soya, etc. que a su vez pueden ser fuentes de extracción. Los productos del mar y la soya son los más accesibles por cuestiones de abundancia y costo.

Las proteínas ya sean de origen vegetal, animal ó microbiano son susceptibles de ser hidrolizadas mediante la acción química ó de enzimas que además de ser abundantes en cuanto a su número y propiedades, pueden ser sustancias recuperables; además, es posible frenar el proceso de hidrólisis enzimática en cualquier momento sin procedimientos drásticos ya que las enzimas tienen condiciones

de acción altamente específicas en las que el pH y la temperatura de operación juegan un papel fundamental.

El fenómeno de la hidrólisis involucra la ruptura de un enlace químico, con la subsecuente formación de nuevas especies, en donde también pueden actuar agentes que favorezcan la transformación, quedando cambios al final del proceso; a este tipo de agentes se les conoce como catalizadores.

Al actuar como catalizadores, las enzimas proteolíticas son las que favorecen la hidrólisis de proteínas sin importar el origen de éstas.

El empleo de uno u otro métodos está directamente relacionado con costos y cualidades finales del producto, si las propiedades de un derivado son prácticamente las mismas cuando se emplean cualquiera de los dos procesos ya sea el químico ó el enzimático es obvio que el parámetro que determinará cual de los dos será el usado, será el relacionado con el costo, decidiéndose por el más económico; si por el contrario, se requiere que el hidrolizado presente propiedades específicas solo alcanzables bajo un proceso enzimático, se justifica un costo elevado que se compensa con la calidad final del producto.

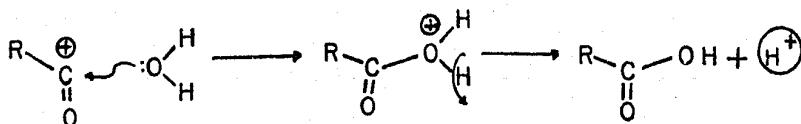
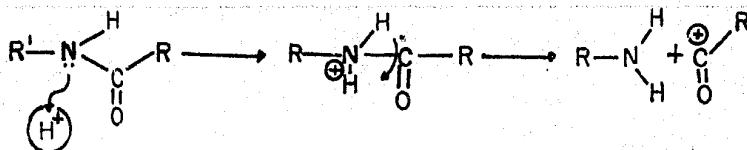
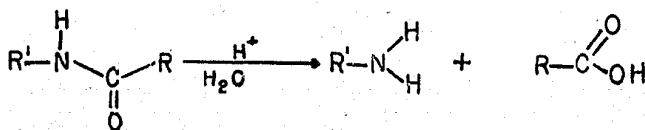
Posteriormente se describirán más detalladamente las ventajas y desventajas de uno y otro con el objeto de poder establecer cual de ellos puede ser en un momento el más adecuado.

CONDICIONES DE HIDROLISIS

3.1 Métodos de Hidrólisis.

Los hidrolizados proteínicos se obtienen mediante métodos químicos y enzimáticos. Los métodos químicos emplean ácidos y bases en caliente, bajo éstas condiciones se logran rupturas en los enlaces de la proteína, obteniéndose el grado de hidrólisis deseado dependiendo de la concentración de ácidos, de la temperatura y del tiempo. Ultimamente se han desarrollado métodos químicos para hidrólisis de proteínas empleando mezclas de ácidos (16-17) con el objeto de romper todos ó la gran mayoría de los enlaces peptídicos y obtener aminoácidos libres, especialmente de péptidos hidrofóbicos que soportan la hidrólisis de HCl, 6, N a 110°C durante 24 ó más horas; para este caso se emplea una mezcla de HCl y ácido trifluoracético 2:1 entre 165-170° C durante tiempos entre 10-25 minutos y aunque actualmente no se usan éstos métodos más que con fines bioquímicos podrían ser, en casos especiales, alternativas de producción de aminoácidos, los cuales aislados pueden enriquecer alimentos deficientes en ciertos aminoácidos abundantes en proteínas no empleadas en alimentación o de productos secundarios de desecho; cierta desventaja de éste método es la destrucción del triptófano, pero el deterioro total de la proteína bajo éstas condiciones resulta no ser muy alto. Si se hace muy necesario el proteger el triptófano se puede usar alternativamente la hidrólisis alcalina ó la adición de sustancias químicas para formar derivados de aminoácidos que soporten la hidrólisis sin llegar a su destrucción. Los métodos enzimáticos emplean una proteasa bajo condiciones especiales que se describirán posteriormente.

El mecanismo propuesto para la ruptura de los enlaces en la proteína se muestra a continuación.



La unión en el enlace C-N mostrado en la reacción, del grupo amino de uno de los aminoácidos y del grupo carboxílico de otro, se conoce como enlace peptídico y representa cada uno de los eslabones que constituyen a las proteínas, en donde dependiendo de la secuencia que sigan los aminoácidos así como el número de éstos que integran la molécula determinarán las propiedades de cada una de ellas ya que los aminoácidos debido a su estructura química tienen dos zonas susceptibles de formar un enlace como el anteriormente descrito, pues todos estos se consti

tuyen por un grupo amino, un grupo carboxilo y un radical que - dependiendo de sus características determinará las propiedades de cada uno de éstos. Los aminoácidos encontrados más comunmente en las proteínas se enumeran en la siguiente tabla, clasificándose - según su importancia, en aminoácidos no esenciales y aminoácidos- esenciales, éstos últimos se hace necesario incluirlos en la die- ta diaria para un correcto funcionamiento del organismo.

NOMBRE	ABREVIATURA	FORMULA
(+) Alanina	Ala	$\text{CH}_3\text{C}(\text{NH}_3^+) \text{H COO}^-$
(-) Asparagina	Asp (NH)	$\text{H}_2\text{NCOCH}_2\text{C}(\text{NH}_3^+) \text{HCOO}^-$
ácido (+) Aspártico	Asp	$\text{HOOCCH}_2\text{C}(\text{NH}_3^+) \text{HCOO}^-$
(-) Cisteína	Cis H	$\text{HSCH}_2\text{C}(\text{NH}_3^+) \text{HCOO}^-$

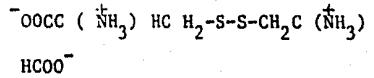
NOMBRE

ABREVIATURA

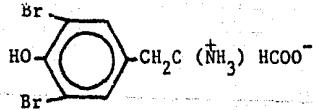
FORMULA

(-) Cistina

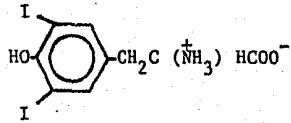
CiS-SCi



(+) 3,5 Dibromotirosina

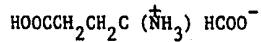


(+) 3,5 Diyodotirosina



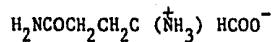
ácido (+) Glutámico

Glu



(+) Glutamina

Glu (NH₂)



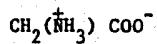
NOMBRE

ABREVIATURA

FORMULA

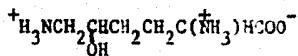
Glicina

Gli



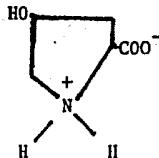
(-) Hidroxilisina

Hilis



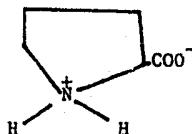
(-) Hidroxiprolina

Hipro



(-) Prolina

Pro



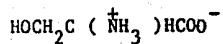
NOMBRE

ABREVIATURA

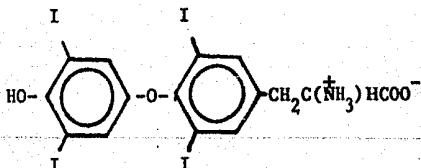
FORMULA

(-) Serina

Ser

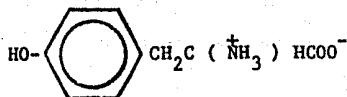


(+) Tiroxina



(-) Tirosina

Tir



AMINOACIDOS ESENCIALES

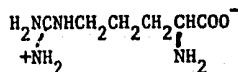
NOMBRE

ABREVIATURA

FORMULA

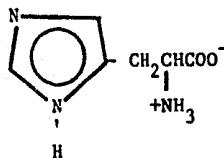
(+) - Arginina

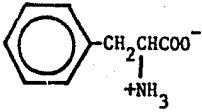
Arg



(-) - Histidina

His



NOMBRE	ABREVIATURA	FORMULA
(+) - Isoleucina	Ileu	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\underset{\substack{ \\ +\text{NH}_3}}{\text{CHCOO}^-}$
(-) - Leucina	Leu	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\underset{\substack{ \\ +\text{NH}_3}}{\text{CHCOO}^-}$
(+) - Lisina	Lis	$+\text{H}_3\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\underset{\substack{ \\ \text{NH}_2}}{\text{CH}_2\text{CHCOO}^-}$
(-) - Metionina	Met	$\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\underset{\substack{ \\ +\text{NH}_3}}{\text{CHCOO}^-}$
(-) - Fenilalanina	Fe	
(-) - Treonina	Tr	$\text{CH}_3\text{CHOHCH}\underset{\substack{ \\ +\text{NH}_3}}{\text{CHCOO}^-}$

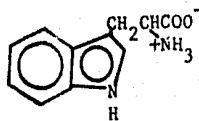
NOMBRE

ABREVIATURA

FORMULA

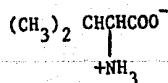
(-) - Tryptófano

Tri



(+) - Valina

Val



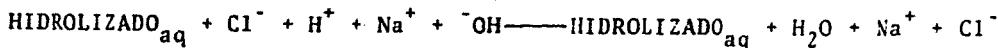
Con esto se puede establecer que los aminoácidos tienen dos ó más formas de enlazarse, por ejemplo: la lisina y la isoleucina se unen peptídicamente formando lisil-isoleucina ó isoleucil-lisina y si se toma en consideración que se conocen más de 25 aminoácidos, entonces las posibilidades de unión son prácticamente infinitas; ya que en una proteína, los aminoácidos pueden repetirse gran número de veces uniéndose a otros, dándole a cada proteína las características que la distinguen en cuanto a su peso molecular, propiedades químicas y más importante aún, determinando las funciones de éstas en los seres vivos.

3.2 Factores involucrados en procesos de hidrólisis.

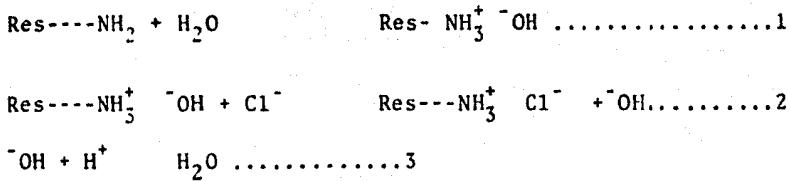
En la hidrólisis química el ácido que se emplea comunmente es el clorhídrico (19) ya que después de verificarse ésta, se procede a neutralizar con hidróxido de sodio logrando así obtener al hidrolizado en medio salino; esto se puede eliminar con el empleo de resinas intercambiadoras de iones, si por necesidades propias de cualidad se requiere eliminar los cloruros.

MECANISMO

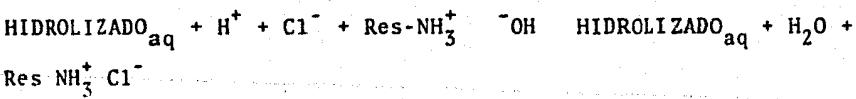
Cuando se emplea NaOH para neutralizar, después de la hidrólisis ácida sucede la neutralización y formación de cloruro de sodio bajo la reacción.



Si se hace necesario un intercambio iónico, entonces se emplea una resina intercambiadora en su forma OH^- , la reacción es la siguiente:



La reacción completa es:



Si se somete a un material conteniendo un ácido frente a una resina en su forma ^-OH , cuanto más fuerte sea el ácido más eficiente será el intercambio iónico, siendo para este caso el HCl un ácido de los más fuertes, facilitando así la neutralización total.

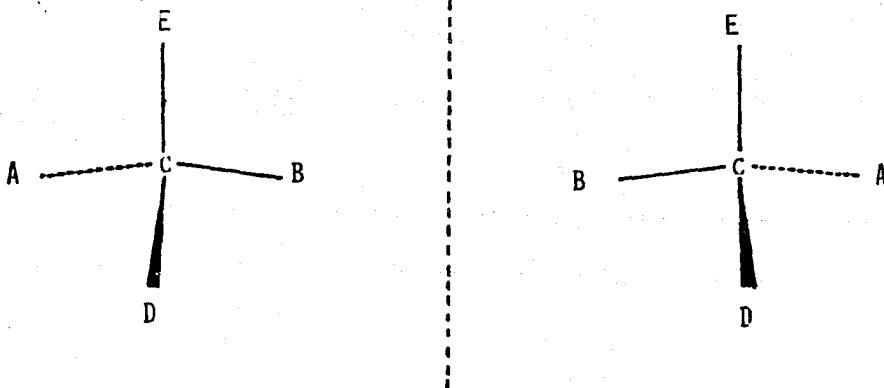
Son entonces éstas dos formas de obtener químicamente un hidrolizado neutro ya sea salado ó libre de iones sodio y cloruro.

Los inconvenientes de la hidrólisis química son las condiciones drásticas de temperatura y pH que conducen a la destrucción de aminoácidos importantes además de una racemización de éstos, la cual no se presenta cuando se emplea una peptidasa, que debido a su elevada especificidad así como a sus condiciones de operación no conduce a modificaciones en la estructura de las especies hidrolizadas, debido a que todos los aminoácidos son ópticamente activos y en las proteínas se presentan bajo una forma específica a excepción de la glicina que por no tener carbonos asimétricos debido a que presenta una estructura muy sencilla no manifiesta actividad óptica.

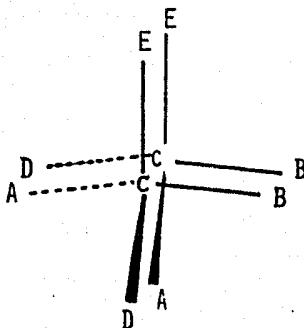
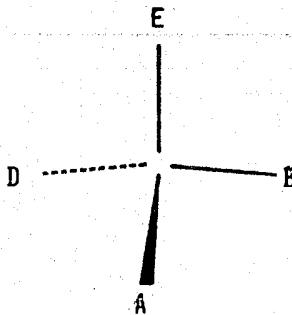
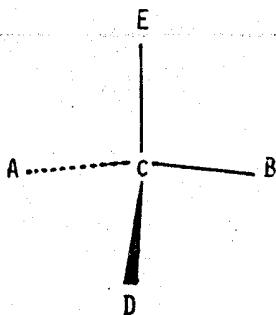
Se dice que un carbono es asimétrico si tiene cuatro sustituyentes diferentes y la molécula que lo contenga será ópticamente activa; la racemización es entonces un fenómeno que produce una mezcla de especies levo y dextro que tratará de representarse a continuación.

Convencionalmente se define a un compuesto levo ó dextro si desvía para un sentido u otro el plano de la luz polarizada; si lo hace a la izquierda es levo, por el contrario es entonces dextro.

Los compuestos levo y dextro son la imagen especular el uno del otro y son **NO** superponibles



La NO superposición se explica cuando una de éstas estructuras es girada 180° sobre su eje y se superpone a la otra observando que los sustituyentes no coinciden uno a uno dando como consecuencia que éstas moléculas presenten características físicas, químicas y biológicas diferentes, de aquí la gran especificidad que manifiestan.



Aquí se nota que los sustituyentes A y D están alternados, formándose por superposición, parejas (E,E) (B,B) (A,D) y (D,A). La actividad óptica de una sustancia es una cualidad intrínseca molecular específica y perfectamente determinada, y en el organismo solo se metabolizan aminoácidos bajo una forma óptica determinada, con lo que se hace notar que la racemización conduce a una degradación en la capacidad nutritiva de una proteína.

3.3 Comparación de Métodos de Hidrólisis.

Por lo expuesto, al mostrar características de uno y otro - métodos se señalan ventajas del proceso enzimático frente al químico. Aunque el empleo de ácidos para preparar hidrolizados es muy usado, (24, 25, 26) es preferible por ciertos aspectos el empleo de enzimas por presentar las siguientes ventajas: a) Son de alta especificidad en cuanto a forma y número de rupturas. (21,23,28,29,30 y 31) . b) No producen cambios químicos indeseables al no haber racemización y degradación de aminoácidos.

c) Pueden recuperarse del medio de reacción sin hacerse necesaria una neutralización ó modificación del pH (20,37)

d) Requieren condiciones controladas para su uso, quedando involucrados múltiples factores, (22,26,27,32) esto puede parecer en primera instancia una desventaja, pero si se tienen en consideración las propiedades finales del producto, es entonces, justificable el ape - garse a las condiciones que lo requieran, todo esto acarrea como resultado que de una hidrólisis por vía enzimática derive un producto con características sumamente especiales, como son el sabor y el olor que no sería posible lograrlos bajo otros procesos. Tanta importancia tienen

las modificaciones del sabor y el olor, que en algunos casos de almacenamiento y conservación de productos comestibles se hace necesario evitar la hidrólisis de origen endógeno no controlada que pueden favorecer las cualidades originales del producto. (12,61,62)

Se conocen alrededor de 2000 enzimas con aplicación industrial, algunas de ellas potencialmente empleables ya que dependiendo de su procedencia surge la posibilidad de su utilización. Pues cada una de éstas produce hidrolizados con propiedades reológicas y organolépticas especiales considerando tanto las condiciones como la proteína empleada.

Por otro lado, la hidrólisis con ácido es barata y accesible y con requerimiento de condiciones menos estrictas que para las enzimas, rinde un producto final con un refinamiento generalmente menor que el obtenido por vía bioquímica ya que la hidrólisis ácida no produce rupturas selectivas en la proteína, estableciéndose así, condiciones de operación en función de los cambios que va sufriendo el hidrolizado bajo tiempo, temperatura, concentración de ácidos, etc. determinados por el análisis del producto en diferentes etapas de proceso. Si la hidrólisis química es satisfactoria puede ser un método conveniente para cualquier uso si se logran determinar las condiciones óptimas de operación y si el grado y selectividad de la hidrólisis no necesita ser de alta especificidad.

3.4 Especificidad Enzimática.

La especificidad enzimática se debe fundamentalmente a que una enzima rompe un enlace peptídico determinado, en el cual, los aminoácidos que lo constituyen, así como la forma de enlazamiento químico que presentan, son los factores que determinan la hidrólisis. Bajo las con

diciones adecuadas de hidrólisis sólo el factor tiempo y el tipo de enzima determina el número de rupturas de enlaces. Como ejemplo se pueden mencionar dos tipos de éstas, las endopeptidasas que rompen las proteínas ó los péptidos intermedamente y las exopeptidasas que actúan sobre los extremos de la cadena peptídica, ya sea sobre el grupo terminal amino ó carboxilo, las primeras se conocen como exoamino-peptidasas, las otras como exocarboxipeptidasas.

Como las enzimas son de origen biológico, las condiciones bajo las que actúan son altamente específicas ya que su acción en vivo requiere de un medio estable y perfectamente determinado por factores y presencia de sustancias que favorecen su eficiencia, si se toman en consideración el pH, la temperatura, activadores, inhibidores, tiempo de acción etc. La modificación de cualquiera de éstos factores redundan en cambios en el producto final ó hasta la desactivación y autodigestión de las peptidasas.

Con el propósito de incrementar su eficiencia, se ha desarrollado el método de inmovilización (20,37) que consiste a grandes rasgos - en adsorberlas en un medio fácilmente separable de los productos finales, después de la hidrólisis y así recuperarlas del medio de reacción cuando se requiera y emplearlas más de una ocasión.

Los inmovilizadores son polímeros del tipo nylon que interactúan electrostáticamente con la molécula enzimática reteniéndola bajo un fenómeno semejante al que sucede con las resinas de intercambio iónico, en el que la capacidad de la recuperación de ésta depende de la afinidad ENZIMA-INMOVILIZADOR.

Existen actualmente otros tipos de inmovilizadores que no interac

túan electrostáticamente con la enzima sino que presentan una unión-química con ésta en su parte terminal dejando su sitio activo libre para verificar el fenómeno de hidrólisis.

Es posible seguir todo un proceso empleando enzimas inmovilizadas (37) en reactores con módulos de microporos plásticos laminares que retienen a la proteasa y permiten su recuperación y frenado del proceso.

3.5 Consideraciones Importantes para la Producción de Hidrolizados.

Es importante mencionar que la proteína a hidrolizar rinde mejores resultados si se emplea desnaturalizada, ya que permite un mejor ataque por parte de la enzima, pues las proteínas presentan estructuras globulares o helicoidales que mantienen aislados un gran número de enlaces peptídicos, los cuales no interactúan con la enzima y la hidrólisis no se verifica ampliamente.

Cuando una proteína con estereoisomería especial, característica para cada una de éstas se desnaturaliza, modifica su configuración espacial haciéndose más elongada y " lineal " lo que proporciona más puntos de ataque y una hidrólisis más eficiente. También el tamaño de partícula del producto sujeto a hidrólisis presenta un punto más en consideración en cuanto a los resultados finales ya que temperatura, tiempo y concentración de enzimas están involucrados con éste factor.

ENZIMAS CON APLICACION EN HIDROLISIS

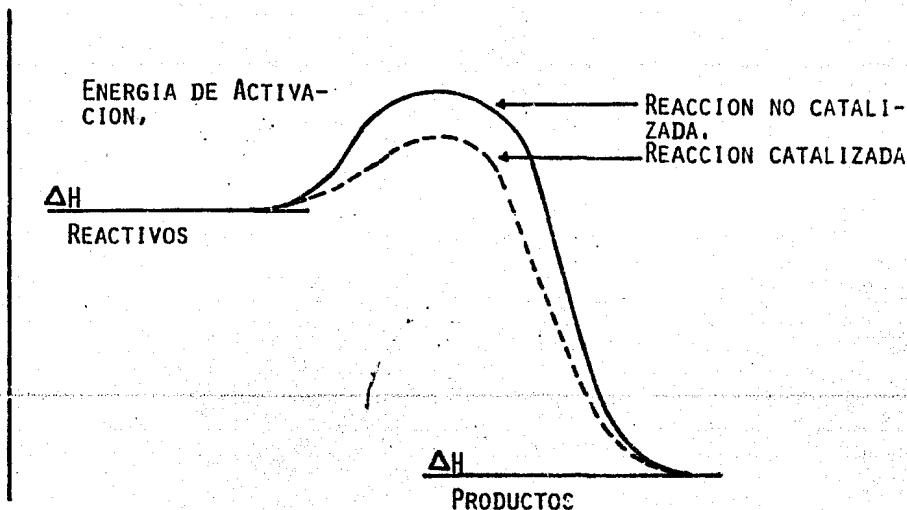
4.1 Como actúan las enzimas.

Las enzimas para todos los casos actúan como catalizadores, es to es un punto muy importante, pues dentro de todos los procesos celulares éstas juegan un papel fundamental dentro del metabolismo, ya sea para síntesis, degradación y aún para procesos de reparación celular.

Las sustancias como la glucosa son transformadas como almacenaje de energía en forma de almidón, glucógeno o como 'combustible' para la actividad celular; para todos estos casos en cada uno de los procesos interviene una enzima, la cual favorece una transformación altamente específica.

Las enzimas disminuyen la energía de activación gracias a su elevado poder catalítico y esto redunda en la aceleración del proceso, - así de acuerdo con el modelo del COMPLEJO ACTIVADO la enzima forma con lo que se denomina sustrato una estructura intermedia con una energía vibracional característica que permite la formación de nuevas especies o un regreso a las condiciones originales dado el carácter reversible que tiene la formación del complejo dentro de una reacción, haciendo notar que un catalizador no modifica el ΔH de ésta, solo el tiempo - que tarda el proceso y así las enzimas son altamente específicas además de ser vehículos valiosos para muchos procesos industriales cuando éstas se tienen aisladas del medio que las origina.

Un esquema de la acción de un catalizador en una transformación - comparada con una no catalizada dará una idea más clara de lo que sucede.



Aquí se observa que la reacción no catalizada necesita más energía para verificarse que la catalizada, pero para ambas el gradiente de entalpía no se ve modificado.

Así que es de esperarse que todos los procesos catalizados por enzimas sean de origen bioquímico, pero que además se pueden imitar ó diseñar sistemas donde se cumplan las condiciones para que favorezcan -- una determinada transformación, como ejemplo de ello se tratarán las peptidasas , dando una explicación de cómo actúan.

La cinética es:

Las reacciones enzimáticas pueden ser mono, di ó trimoleculares y aquí la enzima funciona solo como catalizador por lo tanto no debe sufrir modificación al final de la reacción, es decir, una enzima antes y después de la reacción es exactamente la misma independientemente --

de los caminos que pueda tomar ésta y de todos los intermediarios que puedan llegar a formarse.

La cinética de las reacciones enzimáticas tiene un tratamiento especial ya que está regida por una serie de condiciones que están determinadas por varios factores fundamentales.

Aunque se considera que la concentración de la enzima con respecto a la concentración del sustrato es baja y en ocasiones muy baja, el sustrato puede llegar a variar considerablemente su concentración durante la reacción ya que debido a la catálisis la velocidad de ésta logra incrementarse altamente.

Si se toma en consideración que una reacción enzimática se lleva a cabo en medio acuoso, entonces fundamentalmente serán tres especies - las que intervengan.

- 1.- El agua que funciona como medio y como acarreador y no modifica sustancialmente su concentración.
- 2.- La enzima al actuar únicamente como catalizador no modifica su concentración y sobretodo esta se encuentra en el punto de saturación al formar el **COMPLEJO ACTIVADO** y se considera igual a la cantidad que interviene en la catálisis dentro de la reacción.
- 3.- El sustrato, que es la especie que sufre la transformación y que además ve modificada considerablemente su concentración cuando está involucrado en una reacción altamente eficiente.

Una reacción enzimática bimolecular es de segundo orden bajo la reacción.



Pero si se considera que la cantidad de enzima no se modifica, entonces no es exactamente una reacción de segundo orden y se denomina -- reacción de pseudoprimer orden.

La ecuación completa de velocidad es:

$$-\frac{dC}{dt} = k C_S C_{H_2O} C_E \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

si C_{H_2O} y C_E = a constantes, entonces la ecuación es

$$-\frac{dC_S}{dt} = k' C_S \quad \text{Donde } k' = k C_E C_{H_2O} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 2}$$

$$-\frac{dC_S}{dt} = k' C_S \quad \text{Reordenando} \quad -\frac{dC_S}{C_S} = k' dt \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 3}$$

INTEGRANDO

$$\int_{C_0}^C -\frac{dC_S}{C_S} = -\ln C_S \Big|_{C_0}^C \quad \longrightarrow \quad -\ln C_S = k' t + C \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 4}$$

$$\int_{t_0}^t k' dt = k' t \Big|_{t_0}^t + C$$

Además dentro de la cinética de las reacciones enzimáticas es posible hacer una aproximación del estado estacionario donde se supone que las concentraciones de ciertas sustancias alcanzan valores constantes donde $dC_i / dt = 0$

En una reacción biomolecular de éste tipo se puede plantear que:



entonces:

$$\frac{d}{dt} C_A = k_1 C_A C_B + k_{-1} C_C \dots \dots \dots \text{Ecuación 5}$$

$$\frac{d}{dt} C_B = - k_1 C_A C_B + k_{-1} C_C + k_2 C_C \dots \dots \dots \text{Ecuación 6}$$

$$\frac{d}{dt} C_C = k_1 C_A C_B - k_{-1} C_C - k_2 C_C \dots \dots \dots \text{Ecuación 7}$$

$$\frac{d}{dt} C_D = k_2 C_C - k_{-1} C_C \dots \dots \dots \text{Ecuación 8}$$

Si se hace la suposición de que $\frac{d}{dt} C_C = 0$ entonces al definir el pseudo

- orden de formación de D la expresión queda como sigue:

$$k_1 C_A C_B - k_{-1} C_C - k_2 C_C = 0 \text{ entonces } \frac{d C_C}{dt} = k_1 C_A C_B -$$

$$k_{-1} C_C - k_2 C_C \text{ y } C_C \text{ es } -k_1 C_A C_B / -k_{-1} - k_2$$

sustituyendo

$$\frac{d C_O}{dt} = k_2 (-k_1 C_A C_B / -k_{-1} - k_2) - k_{-1} (-k_1 C_A C_B / -k_{-1} - k_2)$$

$\frac{d C_O}{dt} = k_1 C_A C_B$ resultando ser una reacción de pseudo segundo orden.

Las reacciones enzimáticas tienen consideraciones especiales de inhibición ya sea inhibición competitiva y no competitiva, para el caso especial de algunas enzimas tiene relación con agentes reductores u oxidantes, iones metálicos o agentes complejantes.

4.2 Que son las Enzimas Proteolíticas.

Las enzimas proteolíticas son estructuras proteínicas de características específicas que debido a sus propiedades son capaces de favorecer rupturas a nivel de enlaces peptídicos. Gracias a ciertos estudios encaminados a comprender mejor los mecanismos de la hidrólisis enzimática ha sido posible establecer avances considerables en

cuanto al conocimiento de sus estructuras y mecanismos, a continuación se exponen puntos importantes acerca de las enzimas que permiten hacer una generalización de características estructurales y funcionales de éstas.

- 1.- La configuración espacial del sitio activo debe permitir una rápida transferencia electrónica entre el residuo aminoácido de la enzima y el sustrato.
- 2.- Los residuos de aminoácidos que rodean al sitio activo conservan una configuración espacial que determina la especificidad sobre el sustrato.
- 3.- La relación entre el sitio activo con los residuos de aminoácidos determina la acción específica.
- 4.- La estructura específica debe guardarse para toda la molécula de la enzima para que cumpla las condiciones antes descritas. Es bien conocido que los cambios de pH y temperatura producen desnaturalización de las proteínas. La desnaturalización se explica por cambios en los pliegues de la cadena peptídica. Dependiendo de las condiciones, las proteínas cambian su estructura intramolecular íntima, esta característica es distintiva para proteínas, por lo tanto las enzimas deben tener una configuración definida para actuar como catalizadores. Dada la delicada estructura de las enzimas y su sensibilidad por los sustratos específicos requieren cuidadosas condiciones cuando éstas se utilizan para procesar alimentos.

Todas las enzimas proteolíticas aunque tengan orígenes semejantes tienen propiedades y características que las definirán, pues la en-

zima tiene diferentes grados de selectividad y afinidad para cada enlace peptídico, así para unos favorecerá la hidrólisis rápidamente y para otros será completamente inactiva.

4.3 Como se Clasifican las Proteasas.

Las enzimas actúan sobre cualquier proteína sea cualquiera su origen pues químicamente hablando un enlace peptídico tiene exactamente la misma estructura y las mismas propiedades si proviene de animal ó vegetal, más específicamente un enlace que dé origen por ejemplo al dipéptido - leucil-glicina será exactamente el mismo para una proteína de soya ó para la hemoglobina.

Dado que se conocen actualmente varias enzimas comerciales y sus propiedades están bien definidas, su origen y características parecen tener una fuerte relación, a continuación se muestra la siguiente clasificación.

Según el sitio activo se clasifican en cuatro grupos:

1.- Serino-proteasas, las cuales tienen un residuo seril en su sitio activo. Estas son fuertemente inhibidas por DFP, el cual reacciona con el grupo hidroxilo del residuo seril específico. Todas éstas enzimas son endopeptidasas como la tripsina, quimotripsina, eleastasa y suptilisina.

2.- Sulfhidril-Proteasas, estas enzimas dependen su actividad de uno ó más grupos sulfhidrilo, en el sitio activo los agentes oxidantes, los alquilantes y los iones de metales pueden inhibir a éstas enzimas por unirse con el grupo tiol del aminoácido.

La papaina, la bromelina, la ficina y proteasas microbianas pertenecen a este grupo.

5.- Metaloenzimas, estas enzimas contienen iones metálicos generalmente en una relación estequiométrica con su molécula. Los metales que intervienen son magnesio, cinc, cobalto, fierro, mercurio, cadmio cobre ó níquel ; el metal puede estar fuertemente asociado a la molécula de enzima o ser separado con facilidad por algún agente complejante como EDTA.

Todas estas enzimas pierden su actividad cuando por la adición de éste. Todas éstas enzimas son fuertemente inhibidas por cianuros.

A este grupo pertenecen las carbopeptidasas, algunas aminopeptidasas y algunas enzimas bacterianas.

4.- Proteasas ácidas, la presencia de los grupos carboxílicos en el sitio activo de la enzima dá las características de este grupo, al que pertenecen la pepsina, la renina y muchas enzimas microbianas activas todas a pH en el rango 2-4.

Los agentes diazo y el p-bromofenilbromuro inhiben a estas proteasas.

4.4. Condiciones de Acción Enzimática.

A.- Acción del pH.

Aunque recordando que algunas enzimas como las ácidas funcionan a pH bajos del orden 2-3 y hasta pH 1 para la pepsina; la gran mayoría actúa cerca de la neutralidad ± 2 unidades y cuando se trabaja al pH adecuado la enzima baja en su actividad, se inactiva o desnaturaliza.

B. Temperatura.

Las hidrólisis enzimáticas se verifican a temperaturas entre los 37-40°

C, pero si esta se incrementa, la velocidad de reacción se puede elevar y llegar a temperaturas aún superiores a los 50-55° C; dependiendo de la labilidad de la enzima, así para enzimas delicadas ó sensibles, estas temperaturas son muy altas e inadecuadas.

C.- Activadores.

Todas las enzimas necesitan un agente que al interactuar con éstas las-active, el agente activador puede ser desde un agente común como un ión metálico hasta una molécula proteínica que suele llamarse coenzima; también otras sustancias suelen ser activadores, en ocasiones los agentes oxidantes o complejantes como los sulfatos o los cianuros.

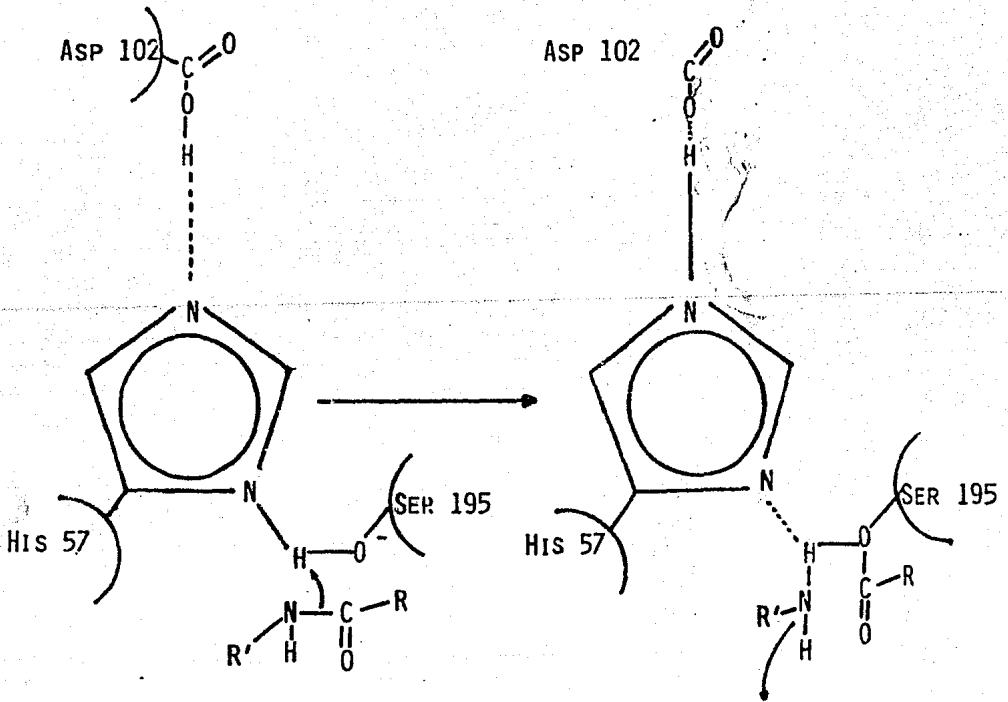
D.- Mecanismos

Muchas estructuras de enzimas fueron determinadas mediante el estudio con rayos X y presentan constitución globular con estructuras características cada una de ellas.

Un caso concreto, la quimotripsina preferentemente rompe uniones peptídicas donde la parte carboxílica es derivada de aminoácidos que tienen una parte aromática en la cadena, como la fenilalanina y tirosina ó partes de las cadenas voluminosas de naturaleza hidrofóbica como la leucina y la isoleucina.

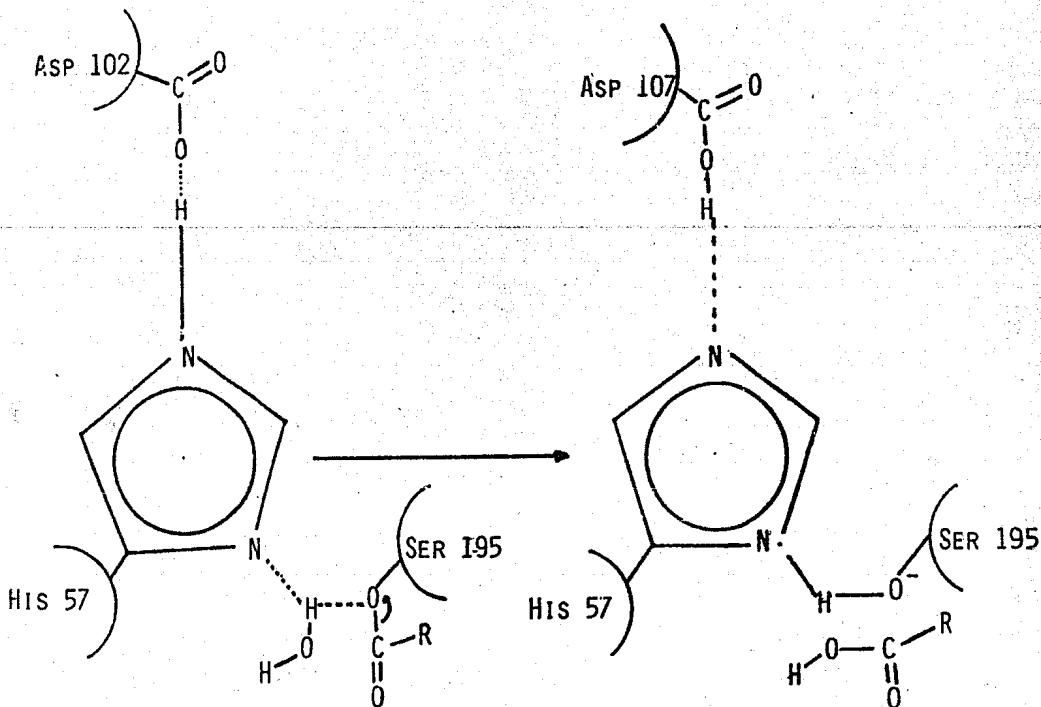
Estudios cristalográficos y de refracción de rayos X han permitido analizar el complejo enzima-sustrato para este caso quimiotripsina formil-L-triptófano y determinar su configuración espacial. Basándose en éstos estudios el proceso se explica por la transferencia electrónica entre la posición específica de un residuo de aminoácido del sitio activo. Gracias a esto se proponen mecanismos de acción catalítica.

Mecanismos de Acilación



Mecanismos para quimotripsina.

Mecanismo de Desacilación



E.- Inhibidores.

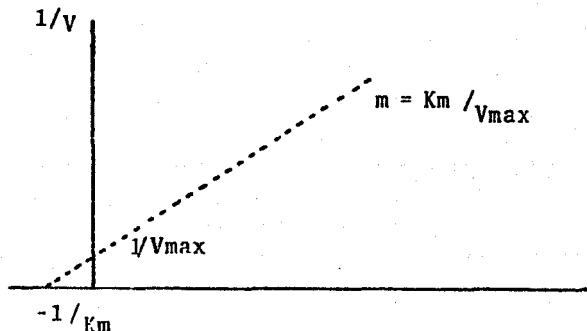
Las enzimas también interactúan con especies que bloquean su actividad, a éstas sustancias se les llama inhibidores pueden ser inhibidores competitivos ó no competitivos como ya se hizo mención, muchas sustancias actúan bloqueando como son los iones polivalentes, agentes reductores, iones complejantes etc.

A continuación se muestran los mecanismos que siguen estos tipos de reacción.

Inhibición competitiva.

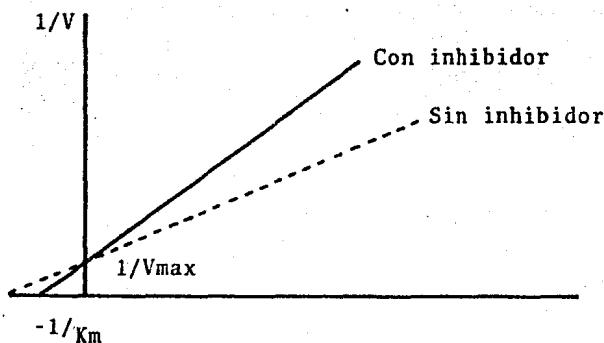
La inhibición competitiva tiene características especiales dentro de la mecánica de Michaelis-Menten la cual tiene muchas aplicaciones en cinética enzimática por su simplicidad y por brindar resultados fidedignos.

Una forma de expresar una reacción catalizada por una enzima según Michaelis Menten es:



$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \left(\frac{1}{[S]} \right)$$

Cuando la reacción es inhibida por un inhibidor competitivo que actúa directamente con la enzima de tal forma que presenta una competencia con el sustrato, ya que también este reacciona reversiblemente con la enzima y sus efectos se ven disminuidos o anulados cuando la concentración del sustrato se aumenta según la ecuación:



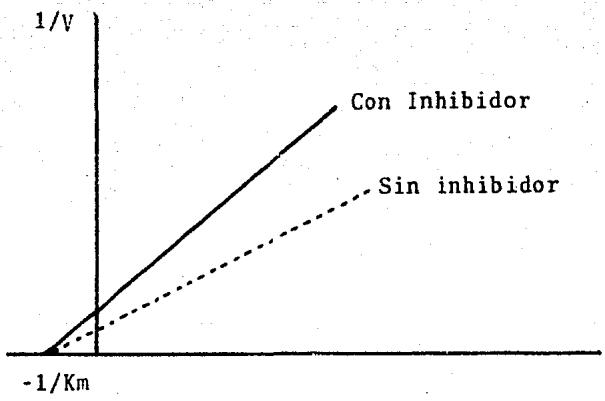
$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right)$$

Al haber más moléculas de sustrato estas compiten con el inhibidor ya que éste estará presente en menor cantidad relativa conforme se aumenta la concentración del primero.

Inhibición no competitiva.

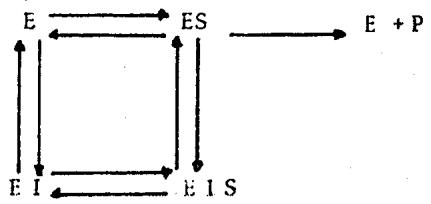
En la inhibición no competitiva se presenta el caso en el que la en-

zima interactúa fuertemente con el inhibidor bloqueando los centros activos de la primera y desfavoreciendo el proceso catalítico en forma irreversible a menos que se adicione un agente que elimine al inhibidor, por lo tanto la inhibición no competitiva toma la forma.



Aquí la K_m ó constante de Michaelis- Menten no se modifica, pero la V_{max} si, de hecho se ve disminuída según las características del inhibidor.

La reacción queda expresada como: $V_{max} = V / (1 + [I] / K_i)$



La enzima puede tomar estos caminos

4.5 Enzimas específicas.

Independientemente de las fuentes donde son obtenidas las enzimas, todas estas, mientras puedan ser comerciales deben de encontrarse bien estudiadas y caracterizadas para poder definir mejor sus aplicaciones y en que condiciones y bajo cuales parámetros obtener el mayor provecho posible.

PROTEASAS MICROBIANAS

Las proteasas microbianas de interés, desde el punto de vista de su aplicación en la industria alimenticia son enzimas extracelulares. El número de microorganismos que secretan proteasas es extraordinariamente grande.

Estas enzimas se han agrupado conjuntamente ya que tienen como origen común a los microorganismos.

Entre estas se encuentran las proteasas fungales y bacterianas. Las primeras se emplean para modificar las proteínas del trigo utilizadas en panificación y en ablandamiento de carnes; además tienen un papel importante en la producción de quesos. Las proteasas bacterianas se aplican en los hidrolizados de proteínas y como suplemento en alimentos para ganado.

Entre los principales microorganismos utilizados para la producción de estas enzimas se encuentran el Aspergillus oryzae, Aspergillus niger y Bacillus subtilis.

En comparación con las proteasas vegetales tienen una baja estabilidad térmica. Por ejemplo, las proteasas de *A. oryzae* pierden rápidamente la actividad enzimática al someterlas a 50°C por un período de 30 minutos.

Su especificidad es más amplia respecto a los enlaces peptídicos de las cadenas protéicas.

La producción de proteasas microbianas se ha incrementado en los últimos años debido a la gran ventaja económica y a la vez técnica que presentan.

PAPAINA

La papaína es una proteasa sulfhidrúlica que actualmente se emplea extensamente para clarificar cerveza, suavizar carne y como auxiliar digestivo.

La papaína es una enzima obtenida naturalmente a partir del látex de papaya y se obtiene en forma cristalina.

Las características de la papaína son:

Peso Molecular	Punto isoelectrico	%Presente en Látex
21000	8.75	10%

Propiedades de la Papaína.

El sitio activo de la papaína, así como la secuencia primaria de esta enzima han sido bien determinados y esencialmente se han definido los agentes que lo inhiben ó activan, así los agentes oxidantes ó los iones de metales pesados inhiben su actividad y los agentes reductores así como el EDTA restauran su actividad; los cianuros, la cisteína el glutatión reducido y los sulfuros dan resultados variables dependiendo del sistema regulador usado.

La activación por cianuros ó compuestos tiol se debe a la regeneración

del puente disulfuro de la enzima.

La estabilidad de la papaína en solución es buena a pH 5 y muy baja-abajo del pH 3 y encima de pH 11. La actividad óptima para la albúmina y la caseína es a pH 7 y a pH 5 para gelatina.

La papaína es completamente estable a temperaturas elevadas en comparación con otras enzimas proteolíticas. La papaína presenta una amplia especificidad para hidrolizar pequeños péptidos y proteínas y es -- fuertemente inhibida por oligopéptidos que poseen fenilalanina como segundo aminoácido del grupo carboxílico terminal.

FIGINA y BROMELINA

Estas enzimas se asemejan a la papaína por sus propiedades y características pues también son proteasas sulfhidrúlicas y los agentes activantes e inhibidores son prácticamente los mismos, y sus fuentes son importantes, para la ficina el látex del árbol del higo y para la bromelina la pulpa de piña.

Para el tratamiento de la carne, de la cerveza y en la producción de hidrolizados proteínicos estas enzimas brindan resultados semejantes y solo los costos o ciertas condiciones de temperatura y pH pueden ser sus limitantes.

Los mecanismos de activación e inactivación son muy semejantes así como los procesos hidrolíticos de los péptidos y proteínas por lo que la papaína, la bromelina y la ficina pueden ser tratadas conjuntamente.

TRIPSINA

La tripsina es una proteasa de centro activo de serina y tiene su ori-

gen en el tripsinógeno, con un peso molecular cercano a 24,000 el cual se produce a nivel gástrico.

La tripsina se origina cuando el tripsinógeno se hidroliza y se forman un hexapéptido y tripsina, por lo que esto refleja que solo hay hidrólisis de un enlace peptídico, todo esta catalizado por iones calcio.

Propiedades de la tripsina.

La estructura y secuencia de aminoácidos de la tripsina están bien definidos y se sabe que está constituida por 233 residuos de aminoácidos además la tripsina es diferente para cada especie de animal del que proviene.

Esta enzima es muy estable a pH por debajo de 6, siendo el pH óptimo de 3; a pH encima de 6 este se destruye autocatalíticamente por autodigestión.

La tripsina es altamente específica para ciertos enlaces peptídicos, teniendo efecto especial sobre los aminoácidos básicos como la lisina y arginina. La tripsina es inhibida por DFP y en relación estequiométrica; por ciertos iones .

RENINA

La renina es una proteasa ácida gástrica y es la proteasa más ampliamente utilizada en la elaboración de quesos ya que favorece la precipitación de la caseína, la principal proteína de la leche.

La renina se forma de un precursor inactivo, la prorenina la cual se convierte en la primera por una hidrólisis parcial ya que la prorenina tiene un peso molecular de 36,000 y la renina de 31,000, la prorenina -

cambia rápidamente a renina a pH 5 por autocatálisis.

Esta enzima es estable en un rango de pH de 5.3 a 9 pero es más activa en el rango 5.3 - 6.3 y a pH bajos de 3.5 - 4.5 su actividad desciende por autodigestión así como su capacidad para cuajar la leche desaparece rápidamente de pH 7 a alcalino.

La precipitación de la caseína de la leche tiene una importancia especial, ya que la leche es un alimento altamente proteínico y estas proteínas sufren transformaciones favorables, además que con tratamiento adecuado ya sea por reacción directa o por adición permite tener una gama de aromas y sabores amplísima. La renina es una enzima que por sus características suele no tener sustitutos, siendo el sustituto más empleado aparte de algunas proteasas microbianas, la pepsina, ya que esta última es también de origen gástrico y estable a pH ácidos donde otras proteasas desnaturalizan.

ALCALASA Y NEUTRASA

De estas enzimas sus aplicaciones han crecido grandemente en los últimos años, ya sea usándose como producto comercial industrializado a partir de los microorganismos que las generan. Como su nombre lo indica éstas proteasas operan a pH alcalino y neutro respectivamente y existen bacterias y hongos capaces de producir según el pH del medio una u otra enzima.

La industria de los detergentes tiene en las alcalasas su principal aliado debido al pH de actividad para éstas, que está en el rango 9-11, ahora también tanto la alcalasa como la neutrasa se emplean para la hidrólisis de proteínas, ésta última tiene su máxima actividad a pH entre

7 y 8.

Las enzimas más importantes son las Subtilisinas producidas por Bacillus subtilis; pero también hay microorganismos como Aspergillus nidulans que las producen. Cuando estos microorganismos son inoculados a proteína de huevo se les induce a generar cantidades considerables de acidasas, neutrasas y alcalasas. (66)

También estas enzimas son empleadas para lograr almidones bajos en proteínas mediante tratamiento directo del grano macerado.

Existen estudios para identificar las condiciones óptimas de operación para hidrólisis de proteínas empleando neutrasa (Bacillus subtilis) y alcalasa (Bacillus licheniformes) y su relación con propiedades funcionales (69) encontrándose aplicaciones en la producción de hidrolizados proteínicos de soya, decoloración de hemoglobina, recuperación de carne a partir de desecho óseo, incremento en el rendimiento de leches de soya y producción de hidrolizados por levaduras.

OBTENCION DE HIDROLIZADOS PROTEINICOS.

5.1 Clasificación de las Proteínas

Las proteínas según su estructura y función pueden ser clasificadas en grupos para su estudio y aprovechamiento dentro del área de los alimentos, según la composición de éstas así como su solubilidad son puntos de gran importancia además de otras cualidades como su función y forma.

A continuación se muestra una tabla de clasificación para facilitar su estudio:

CLASIFICACION	PROPIEDADES	EJEMPLO
A.- Por su forma		
1.-Globular	Esféricas u ovoides Forman fibras de tejido conectivo Pelo, Lana, uñas, cuernos Proteína Muscular	Albumina de Huevo Colágena Queratina Miosina y Actina
2.-Fibrosa		
B.- Por su Composición		
1.- Simple	Contiene solo aminoácidos Contiene una fracción no proteica.	Insulina
2.- Conjugada		
a) Glucoproteínas	Contiene carbohidratos	Inmunoglobulinas, fracción 7S de la soya, caseína K, mucina
b) Fosfoproteínas	Contiene fósforo	Caseínas de la leche, flavo proteínas, pepsina
c) Lipoproteínas	Contiene Lípidos	Lipovitellina de la yema del huevo.
C.- Por su función		
1.- Estructural	Forma parte de la estructura del cuerpo	Proteínas clasificadas como B-2
2.- Enzimas	Catalizan reacciones biológicas	Lipasas, Proteasas
3.- Hormonas	Mensajeros químicos	Insulina, glucagón
D.- Por su solubilidad		
1.- Albúmina	Solubles en agua y soluciones salinas	- Lactalbúmina de la leche, ov-albúmina del huevo
2.- Globulinas	Poco solubles en agua, solubles en sol. Salinas	Miosina del músculo, globulina del plasma
3.- Histonas	Alto contenido de aminoácidos básicos No coagulan por calor	Proteínas unidas a ác. nucleicos

CLASIFICACION	PROPIEDADES	EJEMPLO
4.- Glutelinas	No coagulan por calor Insoluble en agua y alcohol Solubles en alcalis y ac. dé biles	Gluten de Trigo
5.- Prolaminas	Soluble en 70% de alcohol	Zeína de maíz, gliadina del trigo
6.- Escleroproteínas	Insoluble en la mayoría de los solventes	Todas las proteínas Clasificadas B-2 en esta tabla

5.2 Propiedades Funcionales de las Proteínas.

Las proteínas al tener tan variadas características pueden relacionarse a lo que en química de alimentos se conoce como propiedades funcionales.

Las propiedades funcionales tienen conexión con las cualidades propias del producto protéico en cuestión y tienen enlace directo con las transformaciones a las que se somete un alimento.

Gran número de proteínas no presentan propiedades funcionales adecuadas para ser consumidas y por esto su uso está limitado, pero el uso de enzimas hace posible modificar sus características hasta hacerlas idóneas para éste fin, así si los cambios fisicoquímicos y químicos que se ven involucrados con los diferentes pasos y formas de hidrólisis redundan en beneficios, se logra de un mismo producto una serie de derivados con especiales características cada uno de ellos.

Dentro de las propiedades funcionales se pueden mencionar las propiedades térmicas; éstas están relacionadas a las modificaciones que sufre el producto sometido a la acción del calor y pueden mencionarse, la gela

ción, la coagulación y el espesamiento. Al respecto existen estudios que relacionan estas propiedades y la hidrofobicidad para alimentos (66) en donde se encuentra una fuerte correlación entre funcionalidad térmica y la hidrofobicidad de proteínas no desdobladas en combinación con los grupos SH de éstas.

Además se considera como propiedades funcionales la hidratación y todo lo involucrado a este fenómeno como es la solubilidad, dispersión, absorción de agua, espesamiento, viscosidad, formación de masas etc.

Reológicamente se pueden considerar entre otros la elasticidad, la cohesión, formación de redes, agregación, gelación.

Organolépticamente se cuentan el color, el sabor, el olor, la textura etc.

Otras propiedades están relacionadas con los fenómenos de superficie y se pueden considerar dentro de éstas la emulsificación, la espumación, la estabilización, formación de complejos lípido-proteicos así como también todos los cambios enzimáticos que se relacionan a cualquiera de estas propiedades.

Combinando diferentes tipos de alimentos con funcionalidades específicas, se pueden lograr productos con cualidades altamente especiales.

5.3 Tipos de Hidrolizados Proteínicos.

Debido a la gran cantidad de enzimas, así como los diferentes orígenes que tienen, la cantidad de hidrolizados obtenibles es muy variada. La proteína de soya, el gluten de trigo o maíz ó proteínas de leche son la materia prima para obtener éstos, algunos hidrolizados ya son muy comunes, muchos de ellos con fuerte sabor " oriental " como la salsa de

soya. Entre los productos orientales empleados como aderezo se cuentan el miso y el tempe preparados a partir de soya y arroz mediante procesos de maceración del grano y la siembra en el medio de un microorganismo encargado de la transformación tipo Aspergillus aryzae, Rhizopus oligósporus, etc. Los procesos de fermentación han sido perfectamente de terminados e identificados los productos secundarios que comunican sabores y aromas peculiares así como los tiempos adecuados para preparación, inoculación, maduración y freno de la hidrólisis. (1)

Los países tradicionalmente productores de fermentados de soya intensifican estudios para el mejoramiento de las propiedades de las materias primas para éste propósito (2), eficientizando los procesos y mejorando las cualidades del producto final; esto involucra el beneficiar los granos adecuados (3) y además hacer una selección de las cepas más adecuadas para este fin (4). Esto ha permitido desarrollar una tecnología de fermentación (5) con control sobre los microorganismos contaminantes que deterioran la calidad final del producto. (6) También el logro de una cerveza cristalina y aún el mejoramiento de sus cualidades así como la optimización del proceso (7), una carne suave ó concentrado de pescado y res que no gelen es obra de las enzimas que son ejemplos de amplitud de este campo.

Cuando se produce una hidrólisis, algunos factores se pueden modificar, como el sabor, que puede alcanzar hasta grados de amargor que bien puede ser no muy aceptado debido a ésta característica. Esto tiene una relación directa con la formación de péptidos con residuos de aminoácidos hidrófobos cuando la hidrólisis se hace muy extensa (8); es entonces importante determinar en que momento hay que frenar la hidrólisis

o que tipo de enzima ó protefna serán empleados. También el uso combinado de enzimas logra mejoras en el producto.

5.4. Condiciones de Hidrólisis.

Las condiciones idealés para obtener un hidrolizado dependerán de una serie de pruebas a nivel experimental que permitan establecer como y de que manera un sistema determinado rinda resultados favorables, pues en la literatura se encuentran concentraciones de enzima que van desde 0.1 % a un 4% y en ocasiones a nivel prueba piloto concentraciones mayores a un 10% con un pH que van desde 2 hasta 11 y temperaturas entre 25° y 80° C por esto es lógico pensar que para obtener los mejores resultados se planteen condiciones originales y mediante un análisis riguroso se establezcan cuales son las más adecuadas en función de las características del producto final. (9,10,11,12,13,14,15)

Al analizar el grado de hidrólisis se puede saber en que momento es conveniente frenarla. Bajo los procedimientos que se describen es posible conocer el camino que va tomando el proceso y así determinar en que punto se obtienen las características deseadas.

El número total de enlaces peptídicos en una proteína (ht) puede -- calcularse de la composición de aminoácidos. Para la mayoría de las proteínas de los alimentos se puede asumir un valor aproximado de 8 meq./g- x gramo de proteína.

Existe una proporcionalidad entre el número de enlaces rotos (peptídicos) y el consumo de base, al mantener el pH constante durante la reacción. Del consumo de base (B) puede calcularse el grado de hidrólisis-- (DH) de la siguiente relación.

NB= Normalidad de la base (NaOH)

MP= Masa de la proteína en g. (N x 6.25)

NT= Número Total de enlaces peptídicos en meq./g. de proteína

Con éstos valores se puede elaborar una curva de hidrólisis con respecto al tiempo, para medir el punto adecuado de esta ya que el grado de hidrólisis (DH) se define como:

$$DH = B \times Nb \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \%$$

Donde

B= Consumo de base

α = Grado de disociación de $-NH_2$ definido como:

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

NB= Normalidad de la base

MP= Masa de la proteína en g. (Nx6.25)

h_{tot} = Número total de enlaces peptídicos en meq./g. de proteína.

Para la proteína de soya se puede utilizar un valor aproximado de 8 meq./g. (referencia)

Así al obtener el valor de (DH) se puede construir una gráfica con el tiempo, notándose una disminución de la velocidad de reacción.

Existe además un método de determinación alternativo con un rango de pH de operación muy amplio, el método es conocido como osometría (8) y cumple con todos los requisitos para determinar el grado de hidrólisis a diferencia del método anterior que solo opera de pH neutro a alcalino. Para obtener hidrolizados proteínicos se puede emplear con muy buenos resultados la papaína y en ocasiones ésta asociada a bromelina ó ficina y plantear al menos en principio probables condiciones, para que con análisis posterior determinar cual es la mejor de todas las alternativas consideradas.

Al principio se puede establecer una variable, por ejemplo la concentración y los demás factores, pH, temperatura, tiempo de hidrólisis, como constantes dentro de criterios que determinan condiciones favorables para la óptima acción de la enzima, posteriormente la modificación sistemática de los demás parámetros.

Más específicamente se describirán métodos tradicionales (Diagrama 1 y 2) para obtener hidrolizados a partir de soya y trigo mediante la acción de enzimas microbianas producidas por organismos los cuales se desarrollan en el medio en donde se verifica la hidrólisis, para así poder ejemplificar el amplísimo campo que comprende la obtención de derivados de proteína. (1)

Con esto se pueden plantear un gran número de posibilidades considerando todas aquellas que rindan hidrolizados con aplicaciones en el área alimenticia.

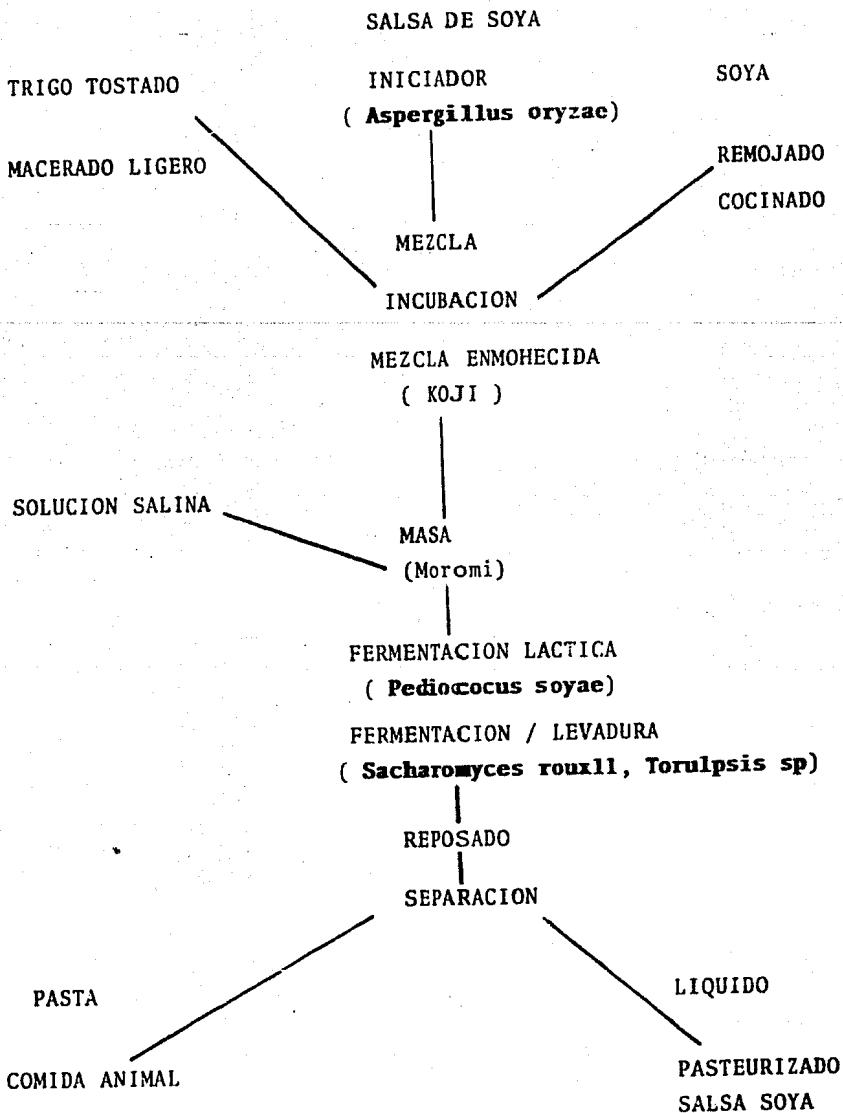


Diagrama 1

T E M P E H

SOYA DESHOLLEJADA TRITURADA

REMOJADO 30 MIN. 25

SECADO

COCINADO 30 MIN.

SECADO Y ENFRIADO

INOCULADO

SUSPENSION DE ESPORAS
(*Rhizopus oligosporus*)

EMPACADO PRENSADO
EN PLATOS DE FERMENTACION

INCUBADO 31 C 20-24 Hrs.

PASTA TEMPEH

Diagrama 2

Estos ejemplos son 2 de los muchos productos obtenibles de gramíneas fermentadas en el lejano oriente, (1) pero podrían mencionarse otros como el Miso, Ontjom, Hanamatto, Sufo, Natto, Idli, Ang-Kam y fermentados de pescado, los cuales se logran con la inoculación de microorganismos-específicos. Actualmente se están haciendo estudios para beneficiar la proteína de sorgo mediante un proceso para eliminar los taninos que comunican sabor desagradable, evitando alterar las cualidades nutritivas de éste y efectuando posteriormente una fermentación sólida con microorganismos del tipo *Rhizopus* (18).

Por otra parte la hidrólisis continua de proteínas o almidón en reactores del tipo fibra hueca (64) que emplean membranas de ultrafiltración son estudiados con el fin de lograr mantener su eficiencia en función del tiempo de operación ya que se ha notado un decaimiento en el rendimiento del 90- $\%$ a 62 $\%$ en lapsos menores de 12 hrs. ; es aquí importante identificar los interferentes como son el envenenamiento de las membranas, efectos de dilución, temperatura de operación, penetración de las enzimas a través de la membrana y daños diversos que puede sufrir el sistema, todo esto con el objeto de poder lograr la aplicación comercial de ésta tecnología como vía de alta eficacia para obtener hidrolizados proteínicos.

5.5. Métodos Análíticos de Cuanteo de Aminoácidos.

Algunos métodos analíticos de determinación de aminoácidos son en ocasiones muy refinados ó complejos y aunque no tienen su aplicación en el área alimenticia pueden resultar ser una herramienta complementaria de alta utilidad si los fines así lo requieren.

Para determinar el contenido de triptófano en una proteína se puede recurrir a una hidrólisis alcalina mediante el uso de NaOH a 155° C que no destruye este aminoácido (38) o es también posible lograr hidrólisis empleando en el medio de reacción sustancias protectoras de aminoácidos importantes cuando se hace esto en medio ácido empleando mercaptoetanol y ácido oxálico (39) como protectores y hacer la determinación de los primeros en un autoanalizador.

Los métodos de Cromatografía de Gases (40) y Cromatografía de líquidos de alta presión (41, 42) son también medios exactos de determinación de aminoácidos cuando se ha logrado la hidrólisis y algunos de éstos métodos determinan hasta picomoles de aminoácidos en un tiempo relativamente corto.

Otros métodos colorimétricos emplean la ninhidrina como reactivo para determinar el grado de hidrólisis (43) desarrollándose para cuanteo de nitrógeno.

De los métodos mencionados no se hace una explicación detallada por quedar fuera de los objetivos de este trabajo.

USOS DE LOS HIDROLIZADOS PROTEINICOS.

6.1 Usos Actuales de los Hidrolizados.

Debido a su versatilidad, los hidrolizados proteínicos tienen aplicaciones en todas las áreas alimenticias, por ejemplo, dentro de los -- condimentos se encuentran aquellos ricos en glutamato (52,53,54) que se logran mediante acción bacteriana y adición de AcOH como preventivo de contaminación microbiana; también sustitutos de sal libres de sodio se obtienen con ácidos orgánicos específicos, KCl, K_2HPO_4 , glucosa y un hidrolizado proteínico con el objeto de enmascarar el sabor amargo que suelen tener éstos sustitutos (55) . Debido a su amplia variedad los hidrolizados son muy apreciados por las modificaciones enzimáticas que se verifican en la proteína de origen y además por los sabores y aromas agradables que proporcionan y para ejemplificar se puede mencionar la -- carne de pollo, que aún teniendo un sabor muy aceptado es posible mediante hidrólisis controladas mejorar sus cualidades organolépticas (50,51) debido a la liberación de oligopéptidos y aminoácidos que enriquecen las cualidades sensoriales de la proteína sometida a la transformación.

Productos de origen marino se obtienen mediante hidrólisis enzimática y química; como ejemplo se tienen todos los derivados de pescado -- que debido a su abundancia en cantidad y especies permite obtener variados productos. Se reportan hidrolizados hechos en etapas mediante procesos de ataque alcalino, ataque ácido y por último empleo de enzimas (26) con finalización del proceso por inactivación térmica de la proteasa; otros trabajos están enfocados al aprovechamiento de enzimas endógenas, a partir de vísceras de pescado (23) se activa pepsina por tratamiento ácido y así se logra un importante abatimiento del costo por no hacerse necesaria la adición de una enzima comercial a la carne de pescado--

para lograr hidrolizados con uso alimenticio. También hidrólisis con H_2SO_4 de carne de pescado rinde una elevada cantidad de aminoácidos - esenciales (24) que resultan ser un excelente alimento con un bajo - costo.

Algunos estudios sobre pescado están dirigidos al análisis bioquímico e histiológico del músculo durante el proceso de salado así como la actividad enzimática interna (32) con el objeto de encontrar las - condiciones de maduración.

De las sardinas se han identificado 5 enzimas, 3 proteínasas alcalinas y 2 ácidas y se ha determinado su especificidad sobre el sustrato - así como su inhibición por adición de sal (33) o también la transformación de proteínas en el pescado boquerón durante el proceso de salado - así como la dependencia con la temperatura de trabajo y la acción enzimática endógena (34) de pepsina, tripsina y fosfatasas ácida y alcalina.

La hidrólisis enzimática ha sido estudiada con la adición de agentes surfactantes (35) empleando como sustrato proteína de pescado notándose un aumento de la acción proteolítica; así también es posible hacer estudios químicos del sabor de péptidos de productos marinos empleando pepsina y pronasa y de los diferentes hidrolizados así como de sus propiedades organolépticas (36) que se obtienen así.

Trabajos enfocados a lograr modificaciones en las propiedades de -- concentrados de pescado (65) son de alta importancia ya que se hacen - con el fin de lograr alta calidad en éstos en función de sus características sensoriales, valor nutritivo, valor biológico y aspectos relacionados con la salud. Los métodos enzimáticos propuestos y desarrollados incluyen la hidrólisis por enzimas endógenas, hidrólisis con enzimas --

comerciales, así como métodos químicos; obtención de hidrolizados húmedos, hidrolizados secos y derivados de proteínas por muy diferentes vías ya sea por separación por disolventes, acción ácida y empleo de sales para selección de diferentes tipos de ésta y lavados sucesivos con el fin de eliminar disolventes, métodos térmicos y de spray-dry para eliminar agua.

Para poder ejemplificar la enorme importancia del pescado y semejantes en la alimentación se incluyen algunos diagramas (diagramas 3 - 8) para hacer más evidente lo expuesto.

PROCESO ESTANDAR PARA LA PRODUCCION DE HIDROLIZADOS DE PROTEINA DE PESCADO.

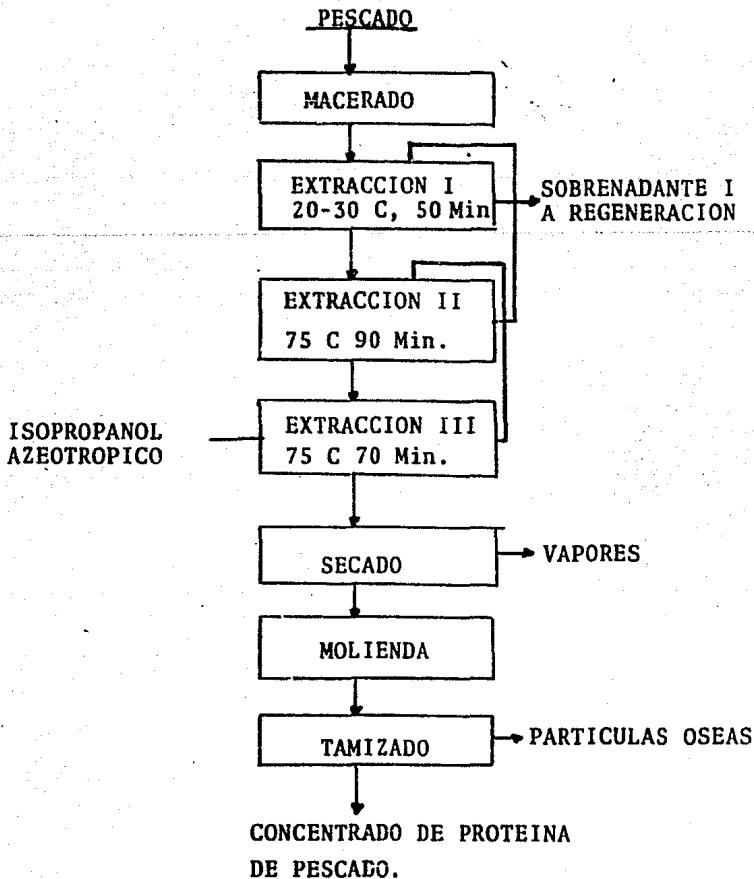


DIAGRAMA 3

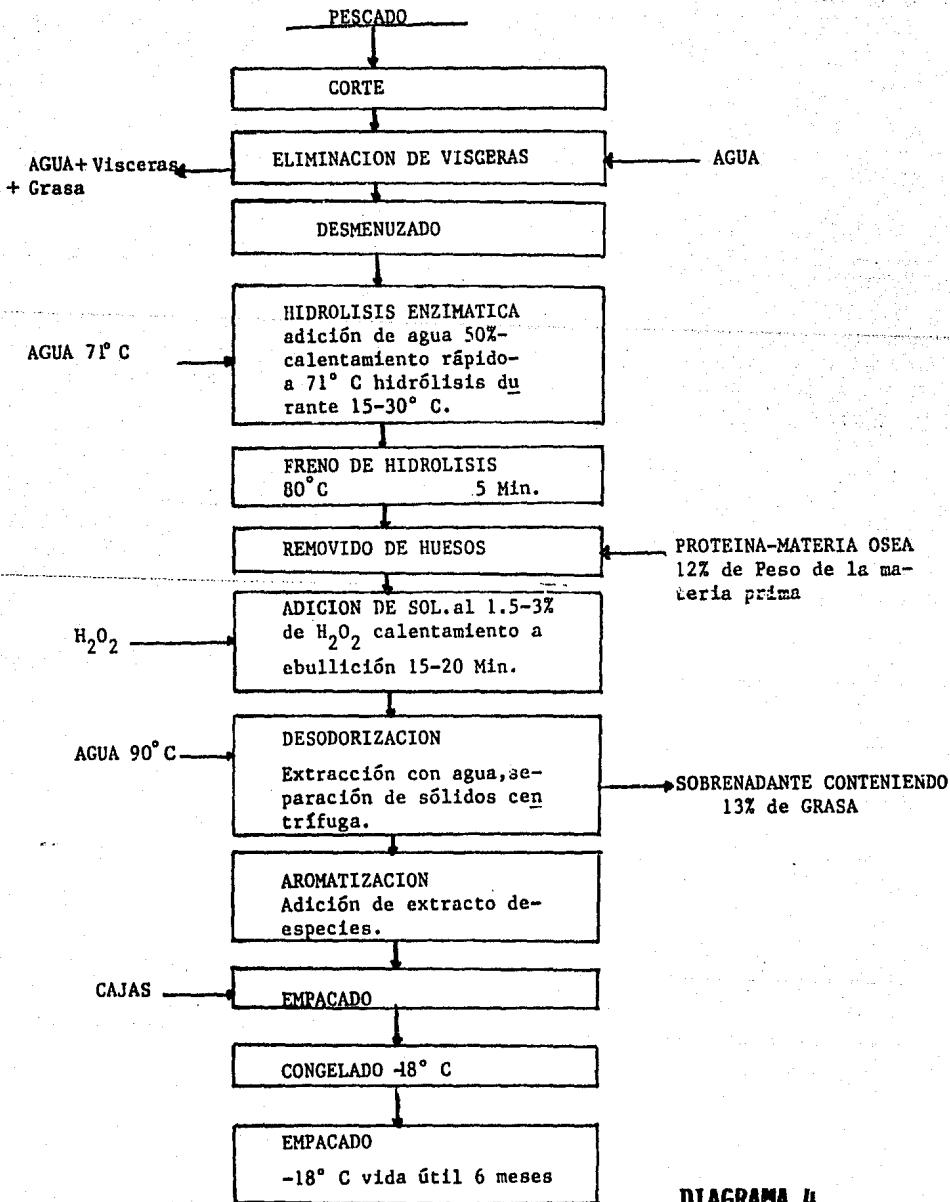


DIAGRAMA 4

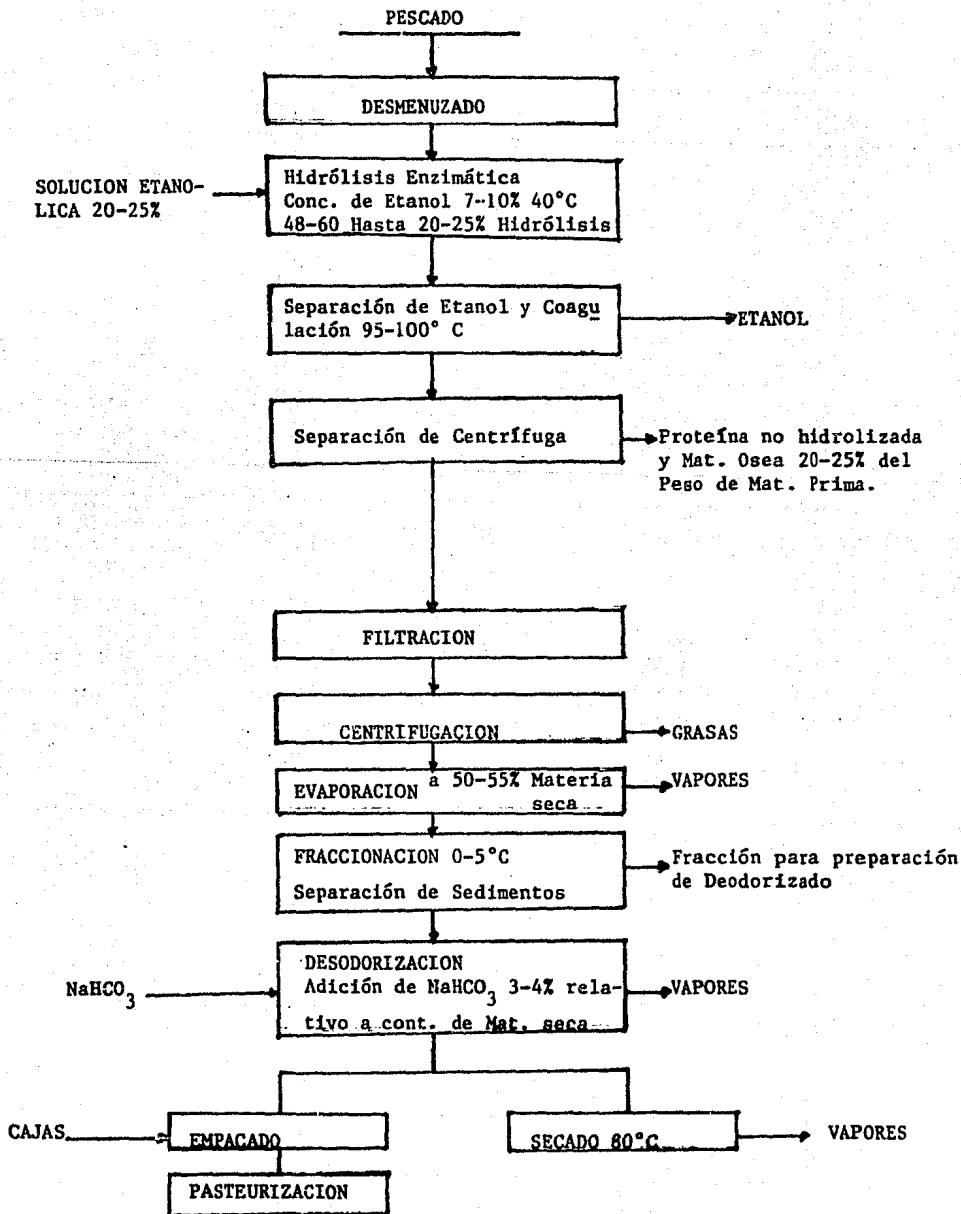
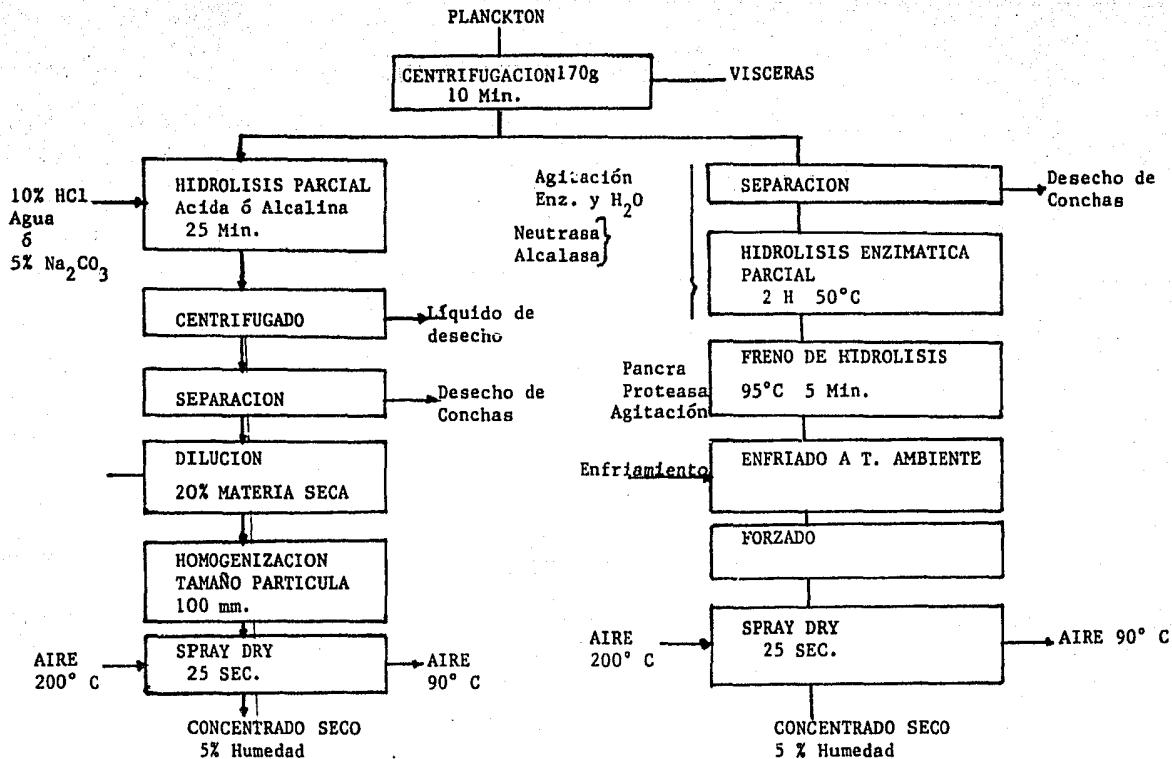


DIAGRAMA 5



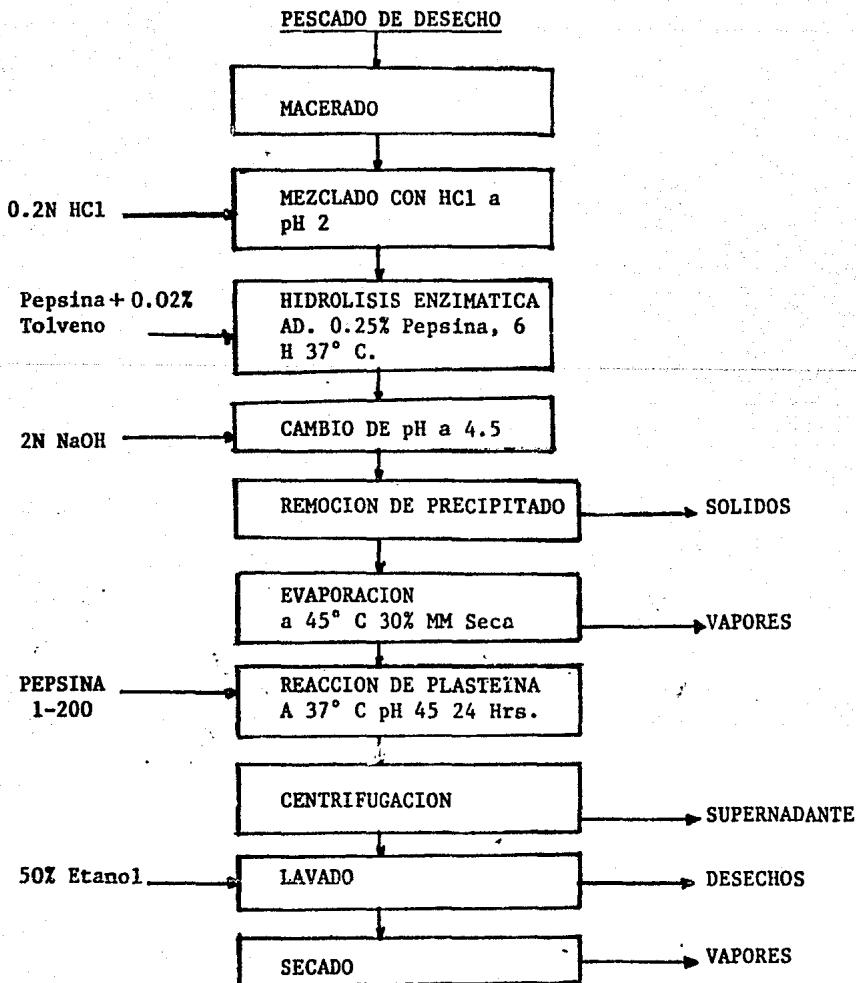


DIAGRAMA 7

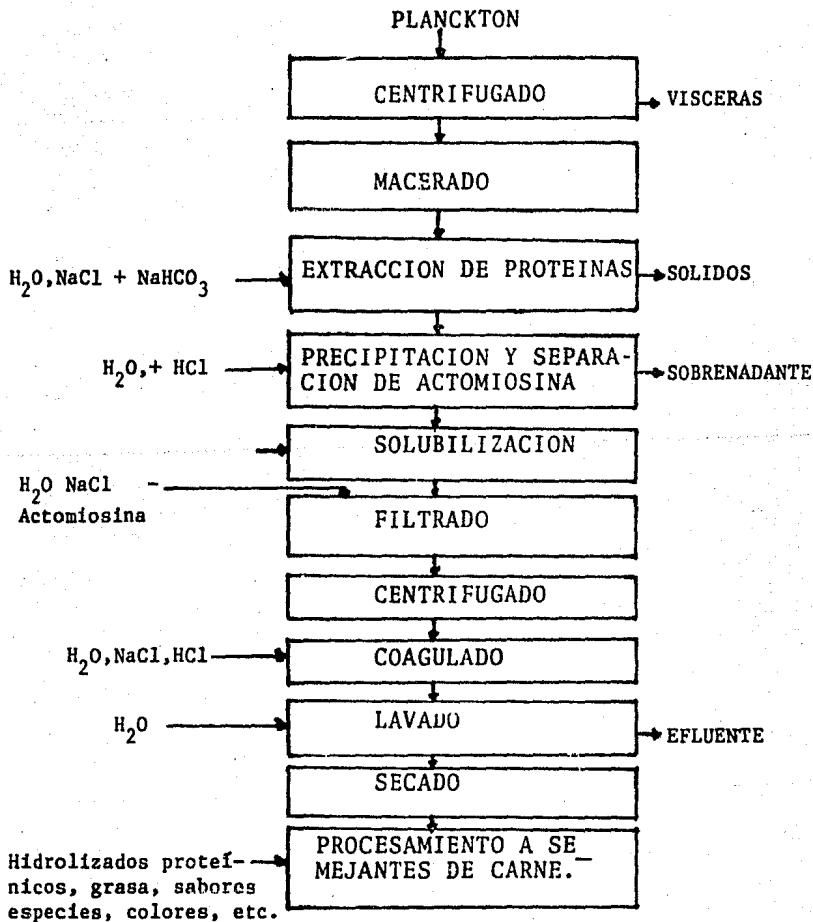


DIAGRAMA 8

Todos los hidrolizados proteínicos están implícitos en el alimento que se consume, sin tener necesariamente que saberlo, así la enorme variedad de quesos existentes, la obtención de una cerveza cristalina, la fabricación de pasteles y panes diversos (70) donde se pueden enriquecer con la adición de hidrolizados proteínicos (56) y aún la suavización de la carne pone en evidencia a éstos mediante la acción de una enzima ó grupo de enzimas que verifican el fenómeno.

Los quesos presentan sabores y texturas muy amplias donde la proteólisis guarda un papel fundamental, tomando como enzima ya sea un producto animal ó bacteriano. Todas las variedades de quesos han sido motivo de estudio para mejorar los procesos de fabricación y maduración así como realzar aromas y sabores. Existen estudios de maduración bajo diferentes condiciones (44) en las que se determinan tanto el nitrógeno proteico, la cantidad de oligopéptidos y la influencia de las enzimas en cuestión, así como el microorganismo responsable(46) y además otros factores que influyen en la evolución del sabor, olor y consistencia de éstos, como la cantidad de sal (45) y su relación con la lipólisis llegando así a determinar la cantidad de Cloruro de sodio óptima dependiendo del tipo de queso.

Sustitutos de leche basados en soya son también empleados junto con leche entera para preparar quesos con características especiales de humedad y acidéz (17) así como la influencia de la soya en la activación de bacterias productoras de ácido láctico y las enzimas proteolíticas presentes en éstos productos.

El aroma de los quesos es también consecuencia de transformaciones paralelas a la proteólisis y éste se atribuye a componentes alcalinos-

volátiles (48) susceptibles de ser determinados para lograr en ciertos casos su eliminación, incremento ó regulación según las necesidades de producir quesos con propiedades especiales.

Para la suavización de la carne se emplea generalmente la papaína(30) que al fraccionar las moléculas proteínicas beneficia la textura y sabor de ésta, pero cualquier otra proteasa puede ser empleada como la bromelina, la ficina o tripsina (49) y es posible determinar el efecto de éstas en la suavización de carne así como su influencia en algunos constituyentes químicos del producto cárnico. Muy importante son las mejoras reológicas y organolépticas que se logran mediante la suavización enzimática de la carne además de una asimilación más completa ya que se realiza menor esfuerzo digestivo y se eficientiza el proceso de absorción de aminoácidos a nivel intestinal. Con esto, los hidrolizados pueden tener también aplicaciones terapéuticas muy importantes con fines nutricionales y proteínas ricas en aminoácidos esenciales como la sangre (57) y la albúmina de huevo (58) pueden hidrolizarse completamente, liberarse de productos tóxicos (59) purificarse, adicionarse de conservadores y adaptarse para su aplicación endovenosa junto con otros constituyentes importantes como glucosa, vitaminas y sales minerales.

La hiperalimentación oral (60) es posible cuando el paciente está en condiciones de recibirlo por ésta vía y es la proteína de huevo, bajo hidrólisis un excelente alimento de muy fácil asimilación.

6.2. Usos Potenciales de los Hidrolizados.

Debido a que todas las proteínas pueden ser fuentes para hidrolizados en combinación con la extensa variedad de enzimas, la potencialidad de producción es muy elevado.

Existen fuentes proteínicas capaces de rendir volúmenes de hidrolizados abundantes, especialmente la soya y algunos otros productos - vegetales que han sido reportados como altamente proteínicos, además de productos marinos, muchos de los cuales no son empleados por su bajo nivel de comercialización puesto que no gozan de la aceptación del consumidor debido a su sabor y olor.

Los productos de consumo común que son base de la alimentación de un amplio sector de la población son ricos en glúcidos pero bajos en proteínas, como son las harinas de trigo y maíz; es entonces viable la adición de un producto de hidrólisis que los haga más nutritivos, con la condición de que el precio del producto no se incremente significativamente y sea accesible a las clases populares, por lo tanto, la fuente abastecedora deberá ser abundante y con un costo de producción reducido. La alimentación del infante es también fundamental y los hidrolizados resultan ser un excelente alimento por las ventajas ya expuestas y debido a esto, personas con digestión ó masticación deficientes pueden resolver en gran medida sus problemas de nutrición.

Existen comestibles que funcionan como las pastas para sopa, deshidratados de papa y aún de frijol que aunque resulta buen alimento es susceptible de ser enriquecido al igual que los primeros, también otros denominados chatarra pueden llegar a beneficiarse al igual que algunas bebidas saborizadas y en general cualquier presentación comercial de postres y golosinas.

Proteínas de elevada capacidad nutritiva resultan estar limitadas - en su consumo, debido a que tienen propiedades funcionales inadecuadas, pero la acción de las enzimas puede llegar a convertirlos en productos -

apreciados, no solo como aditivos sino como el alimento directo, adicionado de especias, condimentos o saborizantes para lograr obtener presentaciones muy variadas en el mercado.

Con el desarrollo de la microbiología las perspectivas de producción crecen bruscamente, así como también la variedad de productos derivados de proteínas y enzimas con su origen en los microorganismos, ya que el punto de partida no tiene que ser forzosamente una proteína ó similar, sino un sustrato probablemente accesible y de bajo precio con un rendimiento elevado y un mantenimiento mínimo debido a la eficiencia de transformación por parte de éstos, con la ventaja de que pueden producir proteínas, enzimas ó aminoácidos extracelulares.

6.3 Almacenamiento y Conservación de Hidrolizados Proteínicos.

Resulta de vital importancia el disponer de métodos de almacenamiento y conservación de los hidrolizados proteínicos, si se toma en cuenta que la producción puede llegar a crecer considerablemente, entonces el poder disponer de estos bajo diferentes formas y en la cantidad que se haga necesaria involucra el empleo de todas las formas conocidas para mantener los productos en condiciones adecuadas para su consumo. Dado que las proteínas y sus derivados son productos delicados y perecederos estos deben ser tratados bajo condiciones especiales que permitan que su duración en el mercado sea indefinido y brinde al consumidor sus cualidades sin sufrir deterioro .

El enlatado, como el envasado en frascos de vidrio son de presentación sumamente conocidas y seguras que presentan ventajas de almacenamiento, dado que su vida en el mercado es prolongada, permite llegar al ----

consumo total sin sufrir cambios que degraden el producto. El enlatado y envasado pueden hacerse con adición de conservadores y/o anti oxidantes, en salmuera, al alto vacío, esterilización térmica ó la combinación de estos procesos.

El salado ha sido una de las formas más empleadas para la conser vación, de hecho los hidrolizados empleados como aderezo muchos de ellos tienen un elevado porcentaje de cloruro de sodio que no permite el desa rrollo de microorganismos y por ende la destrucción del producto. Una desventaja de éste sería que la única forma de presentación sería ésta la cual en ocasiones no es muy conveniente dependiendo del uso que se le destine, como se mencionó anteriormente los métodos químicos de hidrólisis involucran en su neutralización un proceso de salinización, pero aún éstos mediante un intercambio iónico pueden ser liberados del exceso de sal y poder ser comercializados bajo la forma más conveniente.

El desecado (66) es otra forma con ventajas de manejo, ya que al estar exenta de agua se facilita éste y puede tener una gran cantidad de usos pues al reconstituirse con agua ó usarse como tal puede tener aplicaciones variadas como las harinas, cafés solubles ó leches en pol vo. El desecado puede lograrse bajo un proceso de spray-dry ó una evaporación con temperatura y vacío y posterior pulverización. Al estar el producto libre de agua su conservación se facilita pues no existe un medio adecuado para el desarrollo de microorganismos y si se hace necesario la adición de un antioxidante o un conservador puede man tener se este producto en condición de consumo por largo tiempo.

Aunque existen otras formas de conservación, las más comunes se -

mencionan como las alternativas más viables, aunque no se excluye la posibilidad de que dependiendo de las propiedades especiales de un derivado se requiera un método de conservación y almacenamiento especial o combinado de los ya descritos.

El congelamiento (65) es un método sumamente difundido y puede ser otra alternativa, ya que bajo este no se requiere en general la adición de conservadores y antioxidantes y su conservación es integral con la desventaja de elevado costo de mantenimiento y de que en regiones donde se haga difícil disponer de equipos para su refrigeración quedarían fuera del alcance del consumidor.

CONCLUSIONES.

- 1.- La demanda de proteína y derivados crece en volumen como en calidad.
- 2.- Las fuentes tradicionales de proteínas son los abastecedores más importantes y comunes de hidrolizados y similares del mercado.
- 3.- La química, la enzimología y la microbiología son herramientas - que independiente o conjuntamente permiten alcanzar los objetivos de producción de hidrolizados a partir de recursos no convencionales.
- 4.- Los recursos marinos, así como los productos vegetales son las -- fuentes proteínicas más viables para lograr el abastecimiento requerido junto con las fuentes ya conocidas.
- 5.- México debido a sus extensos litorales tiene recursos potenciales prácticamente inagotables.
- 6.- Las mejoras nutricionales de alimentos pobres son posibles en alta escala al recurrir al adiciónado de nutrientes de múltiples orígenes transformados adecuadamente.
- 7.- Existen métodos industriales y otros en proceso de investigación y perfeccionamiento para lograr estos objetivos pero la potencialidad de desarrollo de tecnologías es sumamente extensa y compleja.
- 8.- Los países en desarrollo como el nuestro, deben fincar especial interés en la creación de tecnologías así como en la investigación y explotación de recursos capaces de proporcionar cantidades significativas de proteínas.
- 9.- Productos tradicionales y de gran consumo, siguen siendo estudiados para alcanzar mejoras en todos aspectos.

- 10.- Gracias a las modificaciones funcionales de proteína no comerciales, mediante los procedimientos ya mencionados, se hace posible la imitación de productos estimados de consumos cotidiano.
- 11.- La tecnología de alimentos es el área técnico científica con altas perspectivas de desarrollo y crecimiento, por ésto se hace necesario preparar y desarrollar especialistas que actualicen la - investigación de nuestro medio.

REFERENCIAS.

- 1.- Fermented Soybean Foods; Larry R. Beuchat. Food Technology: 64-70 June 1984.
- 2.- Study on increasing the protein utility of soy sauce raw material. Xie, Gangzhong. Tiaowei Fushipin Keji 1981, (2), 7-9
- 3.- Raw material treatment and enhancement of protein hydrolysis in soy sauce production. Bao, Qian. (Peop. Rep. China). Tiaowei Fushipin Keji 1981, (12), 3-10
- 4.- Studies on Imano Soy Sauce Aspergillus. Fermentation Co., Xian (Xian, Peop. Rep. China) Tiaowei Fushipin Keji 1982, (4) 6-9
- 5.- Enhancement of protein hydrolysis in soy sauce mash making and fermentation technology. Bao, Quian (Peop. Rep. China). Tiaowei Fushipin Keji 1982, (3), 1-5
- 6.- Control of Microbian contaminations in Koji making, Li, Zushen (Shangai Inst. Ferment. Sci., Shangai, Peop. Rep. China). Tiaowei Fushipin Keji. 1982, (3), 5-11
- 7.- Intensifications of malting with bioregulators. Todorova, V. (Res. Inst. Wine Brew. Ind., Sofia, Bulg). Kwast Prum, 1984, 30-(2), 29-31.
- 8.- Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. Adler-Nisser Jens (Novo - Ind. A/S Bagsvaerd, DK-2880 Den.) J. Chem. Technol. Biotechnol., 1984, 34 B (3) 215-22
- 9.- Studies on degradation of different types of caseins and proteins by Lactobacilli. Singh, Jasjit; Kaul, AJai. (Div. Dairy - Bacteriol., Natl. Dairy Res. Inst., Karnal. India). J. Food -

Sci. 1981, 46(6), 1954-5

- 10.- Total enzymic Hydrolyzate of whey proteins. Maubois, Jean-Louis; Roger Loic; Brule, Gerard; Piot, Michel (Institut - National de la Recherche Agronomique) Eur. Pat. Appl. 22,019 (Cl. A 23J3/00). 07 Jan. 1981, Fr. Appl. 79/16,483 26 Jun - 1979; 52 pp.
- 11.- Microbial proteolysis in foods as a hygienic factor. Hruby, S. Korbelařova, T; Zezulkova, M. (lek. Fak. Hyg. Karlova Univ. Prague, Czech.) Cesk. Hyg 1981, 26 (8), 370-6.
- 12.- Effect of pH on proteolysis in ensiled legum forage. Mckersie, B.D. (Dept. Crop. Sci., Univ. Guelp. GUelp, Ont. Can N1G 2W1) Agron. J. 1985, 77(1), 81-6.
- 13.- Enrichment of rice with L-lysine and change of flavor and taste by the rice cooked with L-lysine. II Koisumi, Noriko; Kiyota, Maki; Kawada, Emiko; Shoji, Fumi (SAGami Women's Univ. Sagami Japan). Sagami Joshi Daigaku Kiyō 1983, 47, 51-6
- 14.- Effect of bromeline on the protein complex of chicken meat. Buriga, Olga; Vitez Ljubka (Kemijski Inst. "Boris Kidric", Ljubljana, Yugoslavia) Technol. Mesa 1981, 22 (!), 26-30
- 15.- Relative improvements with a proteolytic agent. protein hydrolysis methods and their products. Jorgensen, Sven Branner (Novo Industri A/S) Fr. Demande FR 2,485,036 (Cl. C12N9/54), 24-Dec. 1981. DK Appl. 80/2,674 23 Jun 1980; 25 pp.
- 16.- A new rapid method for acid hydrolysis of protein. Tsugita, Akira; Scheffler, Jean Jacques (Eur.MO1.Bio.Lab., D-6900 Heidelberg

- berg, Fed. Rep. Ger.). Proc. Jpn. Acad., Ser B 1982, 58(!), 1-4
- 17.- A rapid method for acid hydrolysis of protein with a mixture of trifluoroacetic acid and hydrochloric acid. Tsugita, Akira; Scheffler, Jean Jacques (Eur. Mol. Biol. Lab., D-6900 Heidelberg Fed. Rep. Ger) Eur J. Biochem. 1982, 124(3), 585-8
- 18.- Mejoramiento de la calidad de la proteína del sorgo (*Sorghum bicolor*. L. Moench) mediante un proceso de fermentación sólida. González, E. E*; Revah, S*; Alvarez, N; Escalona N; Moreno-Terrazas R. *Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Univ Autónoma Metropolitana, México, D.F. Tecnología de alimentos Vol 19 No. 1, 22-28.
- 19.- Sulfide compounds in hydrochloric acid hydrolyzates of protein Shiota, Osamu; Yamamoto, Yoshiro (Kagawa Prefect. Ferment. Food Exp. Stn., Kagawa Prefect Off., Uchinomi, Japan) Kagawa-ken Hakko Shokuhin Shikenjo Hokoku 1979, (71), 30-4
- 20.- The hydrolysis of gelatin by an immobilized acid protease. II - Enzyme reactor design. Cremer, Gregg A.; Boulton Roger (Dep. - Chem. Eng. Univ. California, Berkeley, CA. 94720 USA) Am. J. Enol. Citic. 1981, 32(1), 18-20.
- 21.- Ratio of amino acids and peptides in protein hydrolyzates. Denyakina. E.K., Nekludov, A.D.; Gerasimova E.V. (All-Union Res-Inst. Technol. Blood Substitutes Horm. Prep., Moscow, USSR). - Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 1983. 19(4), 503-6
- 22.- Continuous enzymatic modifications of proteins in an ultrafiltration reactor. Deeslie, W. David; Cheryan, Munir. (Dep. Food Sci., Univ. Illinois, Urbana, IL 61801 USA). J. Food Sci. 1981

- 23.- Preparation and use of inexpensive crude pepsin for enzyme hydrolysis of fish. Liu, Ling, Lin; Pigott, George M. (Coll Fish, Univ. Washington, Seattle, W.A. 98195 USA) . J. Food Sci. 1981, 46 (5), -1569-72.
- 24.- 95: 78749g Effective treatment of fisheries processing effluents. I. Hydrolysis of fish proteins by mineral acids. Kamiyama, Schinichi; - Suzuki Toshishige M; Goto Tomio; Ujiie, Shuichi; Sasaki, Shizuo; Kimura, Tetsuo Honma; Yukari; Kikuchi, Yoshie (Tohoku Ind. Res. Inst., - Sendai, Japan). Tohoku Kogyo Gijutsu Shikensho Hokoku 1981, 13 1-4.
- 25.- Extracting oil and protein material from fish or fish entrails or livers. Joensen Jon Olavur (Matcon Raadgivende Ingenioerfirma APS).
- 26.- Fish protein hydrolyzate. Limonta, Brasiliano A; Behnke, Ulrich; - Ruttloff, Heinz (Akademie der Wissenschaften der DDR).
- 27.- Acceleration of enzymic reactions in processing of materials for - foods. Zucker, Friedrich Z; Osthaus, Georg (Supraton F.J. ZUCKER G. m.b.H.)
- 28.- Enzymic hydrolysis of heat coagulated potato protein. III. Model for the enzymic hydrolysis of non- pretreated coagulated potato protein with microbial proteases. Berghofer, E; Hein, W. Klaushofer, H; - Steyrer, W; Mittelbach, F. (Inst. Lebensmitteltechnol., Bodenkultur, A -1190 Vienna Austria.) Starch (Weinheim, Fed. Repub. Ger.) 1981, 33 (1), 18-22.
- 29.- A quantitative assay of the proteolytic activity of some soil fungi. Ali, M, I; Naguib, M, I; Amin, Afat A. (Fac. Sci., Univ. Egypt, - Cairo- Egypt) Bull. fac. Sci., CAIRO UNiv. 1977 (Pub. 1983) 50, 21 -8.

- 30.- The effect of meat tenderizer on meat proteins. Mega, Ayako (Coll. Liberal Educ., Yamanashi Univ., Kofu, Japan), Mem. Fac. Liberal Arts Educ. Part 2 (Yamanashi Univ.) 1981-,32, 138-42.
- 31.- Use of enzyme-modified cheeses for flavoring of cheese-based products.-Talbot, L.L; McCOrd, C. (Miles Lab., Elkart, IN - USA). Latte 1983, 8(6) 449-53.
- 32.- Biochemical and histological studies on muscle tissues of anchovy (*Engralius encrasicholus*) and brine during curing. Gutierrez, M. Establier R; Calderon, M; Bravo, E. (Inst. Invest. Pesqu., Cadiz, Spain). Invest. Pesq. 1980, 44(3), 471-83
- 33.- Substrate specificity and salt inhibition of five proteinases isolated from the pyloric caeca and stomach of sardine. Noda, Minoru; Thanh Vo Van; Kusakabe, Isao; Murakami, Kazuo (Inst. - Appl. Biochem., Univ. Tsukuba, Ibaraki, Japan 305) Agric. Biol. Chem. 1982, 46(6), 1565-9.
- 34.- Protein transformation in boqueron fish (*Engraulis encrasi-cholus*) during preparation to anchovies, Calderon, M; Gutiérrez M.; Establier, R.; Bravo, E. (Inst. Invest. Pesqueras Cadiz, - CSIC, Spain.) EFCE Publ. Ser. 1980, 12 (Proc.- Congr. Nac. Quim., 3er, 1980 v2).
- 35.- Effect of surfactants on proteolytic enzymic preparations. Chertova E.N.; Lupova L.M. (Vses. Nauchno-Issled Inst." Biotekhnika", USSR). Maslo-Zhir. Prom-st, 1982, (4), 32-3.
- 36.- Chemical studies of the taste peptides on muscle of aquatic animals. The enzymic Hydrolyzate of moray muscles. Ogawa Atsuko (Mu-

kogawa Vo-Men's Univ., Nishinomiya, Japan). Mukogawa Joshi Daigaku Kiyo, Hifukuhen 1982, 30, 545-548.

- 37.- An immobilized two-enzyme system (fugal α - amylase/glucoamy lase and its use in the continuous production of high conver- sion maltose containing corn syrups. Hausser, Alexander G.; Goldberg, Bruce S.; Mertens, John L. (Tech. Cent., Amerace Corp. Butler, NJ 07405 USA).
Biotechnol. Bioeng. 1983, 25(2), 525-39.
- 38.- Rapid benchtop method of alkaline hydrolysis of proteins. Levi- ne, Rodney L. (Lab. Biochm., Natl. Heart, Lung and Blood Inst., Bethesda, MD 20205 USA) 1982, 236(2), 499-502.
- 39.- Improvement in the hydrolysis of protein samples a new protec- tive reagent in the hydrolysis by hydrogen chloride. Xu, Xiuzh- ang(Inst. Biophys., Acad. Sin., Beijing, Peop. Rep. China).
Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan 1981, 41, 73-5.
- 40.- Sample handling for protein hydrolysis and derivatization of amino acids for chromatografy. Moodie, I.M. (Fish Ind. Res. Inst. Univ. Cape Town, Rondebosh, 7700 S Afr.) Lab. Pract. 1980, 29 (10). 1074-5.
- 41.- Modification and evaluation of a reverse phase high performan- ce liquid chromatographic method for amino acid analysis. Kan, T.A.; Shipe, W.F. (Fep. Food Sci., Cornell Univ., Ithace,N.Y 14853 USA). J. Food Sci. 1981, 47 (1), 338-9, 341.
- 42.- A method for hydrolyzing and determaning the amino acid compo- sitions of picomole quantities of proteins in less than 3 hours

Lookhart, G.L.; Jones, B.L.; Cooper, D.B.; Hall, S.B. (U.S Grain Market. Res. Lab., U.S. dep. Agric., Manhattan, KS. 66502 USA). J. Biochem. Biophys. Methods 1982 7(1), 15-23.

- 43.- Evaluation of the degree of protein hydrolysis in vitro. Fa-
teev, V.M.; Krivokhizhina, T.V. (NII Zemi, Khim, Selsk Khoz.,
Krasnoobsk, USSR) Vopr. Pitan. 1984m (3), 74-6.
- 44.- Proteolysis in Manchego Cheese: Changes in the soluble Nitro-
gen Distribution, Mora, Maria Teresa; Marcos, A. (Fac. Vet.,
Univ. Cordoba, Cordoba, Spain). Arch. Zootec. 1982, 31(119),
27-36.
- 45.- Ripening of Blue cheese. Influence of salting rate on lipoly-
sis and carbonyl formation. Godinho, M.; Fox, P.F. (Dep. Dairy -
Food Chem., Univ. Coll. Cork, Cork. Ire). 1981, 36(8), 476-8.
- 46.- Use of Streptococcus lactis laced mutants for accel crating -
Cheddar cheese ripening. 2. Their effect on the rate of propeo-
lysis and flavor development. Grieve, P.A.,; Dulley, J.R. (Dep
Primary Ind. Otto Madsen Dairy Res. Lab. Hamilton 4007 Austr-
lia). Aust. J. Dairy Technol. 1983.38 (2), 49-54.
- 47.- The use of soybean milk in soft cheese making. II. Organolep-
tic and chemical properties of Domiati cheese made from a mix-
ture of soybean and whole milk. Metwalli, N.H.; Shalabi, S.I.-
Zahran, A.S.; El- Demerdash. O. (Agric. Coll., Minia Univ., Minia
Egypt.) . J. Food Technol. 1982. 17(3), 297-305.
- 48.- The aroma composition of Seiss Gruyere chesse I. The alkaline
volatile components. Liardon, R.; Bosset, J.O.; Blanc B. (nestle
Res. Dep., La Tour- de Peilz, Switz.) Lebersm Wiss. Technol .

1982. 15(3), 143-7.

- 49.- Studies on the effect of meat tenderizers on some chemical constituents of camel and buffalo meats. Foda, Y.H.; Bassioury, S.S.; Adbalia, M.A.; Shehata, M.I. (Dep. Food Sci., Ain-Shams Univ., Egypt). Mesopotamia J. Agric. 1980, 15(1), 93-111.
- 50.- Nonbitter protein hydrolyzates. Stanley, D.W. (dep. Food. Sci. Univ. Guelph, Guelph, ON Can. N1G2W1). Can. Inst. Food Sci. Technol J. 1981, 14(1), 49-52.
- 51.- Microbiological, chemical, and sensory quality changes in fresh meat. III. Carebeef stored at four temperatures. Sison, E.C.; Olaguer, I. L.; Baldonado, E.M.; De mata, M.L.; Gonzalez, R.R. Pimentel, L.A.; Beza, C.G. (coll, Agric., Univ. Philippines, Los Banos, Philippines). Philipp. Agric. 1980, 63(1), 50-60.
- 52.- Glutamate-rich condiment. Nakano Vinegar Co., Ltd. Jpn. Tokyo Koho 80 32,344 (C). A23LI/23), 25 Aug 1980, Appl.76/90, 301. 30 de Julio 1976; 7 pp.
- 53.- Condiment production from protein hydrolysis Nakano Vinegar Co, Ltd.
- 54.- Glutamate-rich condiment. Nakano Vinegar CO., Ltd. Jpn. Tokyo Koho.
- 55.- Sodium-free salt substitute. Mohlenkamp, Marvin J., Jr.; Hiler George D. (Procter and Gamble Co.) U.S..
- 56.- Enhancement of bread dough fermentation with protein hydrolyzates, Nippon Oils and fats CO., Ltd. Jpn. Tokyo, Koho.

- 57.- Preparation of whole blood acid hydrolysate injection. Shoa Ji-Zhi; Wang. Shouming, Sun, Tong.- Zhe; Ji, Xue-Qin; Gu, - Yuan-Zhen (Inst. Hematol., Chin. Acad, med, Sci., Peding Peop. Rep. China). Yao Hsueh Tung Pao 1980, 15(11)
- 58.- Amino acid production from protein hydrolyzate, Jiang, Kong-lin; Qu, Hui (Hubei Huangshi Biochem, Pharm, Fact., Huangshi Peop. Rep. China) Yiyao Gongye 1984,8) 8-9.
- 59.- Nontoxic amino acid mixtures, Pelzbauer, Jiri; Kruf, Miloslav ;Culik, Kareli Masita, Artur.
- 60.- Hyperalimentation composition for oral administration. Kao Corp.
- 61.- Influence of ammonia treatment and time of ensiling on proteolysis in corn silage, Johnson, C.O.L.E.; Huber, J. T.; Berben, W.G. (Dep. Anim. Sci., Michigan State Univ., East Lansing Ml. 48824 USA) J. Dairy Sci. 1982, 65(9) 1740-7.
- 62.- Effect of freezing condictiones on the free amino acid level - and attackability of bread proteins by pepsin. Teshitel, O.V. (Odess. Tekhnol. Pishchev. Prom, Odessa, USSR.)
- 63.- Enzymic control of meltability in a direct acididified cheese - product. Lazaridis, H.N.; Roseanu, J.R.; Mahoney R.R. (Dep. - Food Eng., Univ. Massachusetts. Amherst, Ma' 01003 USA). J. - Food Sci. 1981, 46 (2), 332-5, 339.
- 64.- A CSTR-Hollow-Fiber System for Continuous Hydrolysis of Proteins. Factors Affecting long-term stability of the reactor . W. David and Munier Cheryan. Department of Food Science, University of Illinois 1302 W. Pennsylvania Ave. Urbana, Illinois 61801. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXIV. Ph 69-82 (1982)

- 65.- Modification of technological properties of fish proteins concentrates. Sikorski Zdzislaw E.; Naczek, Marian p. Food Preserv. Tech. Univ. Gdansk Wrzeszow, CRC crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1981 14(3) 201-30.
- 66.- Relationships between protein hydrophobicity and thermal - functional properties of food proteins. Voutsinas L.P.; Nakai, S.; Harwalkar, V.R. (Dep Food Sci., Univ. Br. Columbia. Vancouver, BC. Can, V6T 2A2). Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 1983, 16(3), 185-90.
- 67.- Induction of extracellular protease by egg white in *Aspergillus nidulans* Gill P.P. ; Modi V.V. (Fac. Sci. Maharaja Sayajirao Univ. Boroda), Baroda, 230 - 002 India) Folia Microbiol (Prague) 1981, 26(2), 78 82.
- 68.- Factors improving the steeping process of corn grains, Part II Effect of enzyme addition. Roushdi, Ghali, Y. ; Hassanean A. (Fac. Agric., Tanta Univ. Cairo Egypt). Starch (Weinheim Fed. Rep. Ger.) 1981, 33(1), 7-9.
- 69.- The impact of the enzymic hydrolysis process on recovery and use of proteins. Petersen B. Riber (Novo Co-op Symp) 1980. - (Pub. 1981) 149-75.
- 70.- Baking methods with low temperature fermentation (Part 8) Changes in the solubility and the composition of proteins of flour dough during fermentation. Takeda, Kikuko Karasawa Keiko (Tachikawa Coll., Tokyo, Japan). Tachikawa Tandai Kiyu 1984, - 17, 63-7.