

135
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

" Caracterización de un Alimento Bajo
en Fenilalanina "

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

RAQUEL ESTELA VELAZQUEZ RAMIREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F. 1991.



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.

TABLA DE CONTENIDO

1 RESUMEN GENERAL	1
2 INTRODUCCION	3
3 GENERALIDADES	7
3.1 FENILCETONURIA: ANTECEDENTES HISTORICOS	8
3.2 ALIMENTOS BAJOS EN FENILALANINA	11
3.3 NUTRICION: VALOR NUTRITIVO DE LAS PROTEINAS	15
3.4 HIDROLISIS ACIDA DE PROTEINAS	29
3.5 HIDROLISIS ENZIMATICA	39
3.6 CROMATOGRAFIA	56
3.6.1 Cromatografía de filtración en gel	59
3.6.2 Cromatografía en capa delgada.	65
4 OBJETIVOS	71
5 PARTE EXPERIMENTAL	73
5.1 REACTIVOS, EQUIPOS E INSTRUMENTOS	74
5.2 METODOS GENERALES	76
6 RESULTADOS Y DISCUSION	88
6.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION	89

6.2 HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE LECHE	89
6.3 HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE CASEINATO DE SODIO	95
6.4 HIDROLIZADOS ACIDOS DE CASEINATO DE SODIO.	98
6.5 ELIMINACION DE FENILALANINA DE HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE PROTEINA	98
6.6 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL	104
6.7 CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.	119
6.8 CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO	121
6.9 FORMULACION DEL PRODUCTO	124
6.10 ELABORACION DEL PRODUCTO DESARROLLADO	126
7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	131
8 BIBLIOGRAFIA	134

INDICE DE TABLAS

1.	Alimentos para el tratamiento de fenilcetonuria.	10
2.	Análisis proximal de PHENYL-FREE.	13
3.	Composición de los alimentos: MILUPA PKU-1 Y MILUPA PKU-2.	14
4.	Composición de LOFENALAC.	15
5.	Función de las proteínas.	19
6.	Formas clínicas y bioquímicas de hiperfenilalaninemias.	20
7.	Requerimientos de aminoácidos indispensables en el humano.	26
8.	Reacciones químicas para la medición de hidrólisis de proteínas.	28
9.	Reseña parcial de la clasificación sistemática de las enzimas.	41
10.	Guía de los principios que actúan en los distintos métodos cromatográficos.	58
11.	Requisitos de las técnicas para denominarse cromatográficas.	59
12.	Lista de los reactivos usados en el proyecto.	74
13.	Instrumentos utilizados en el desarrollo del proyecto.	75
14.	Equipos utilizados en el desarrollo del proyecto.	75
15.	Procesos seguidos en la hidrólisis enzimática de leche (5% P/V).	78
16.	Procesos de reacción enzimática de caseinato (S=10%).	80
17.	Procesos de reacción enzimática de caseinato (S=10%).	81
18.	Resultado de hidrólisis enzimática de leche descremada.	93
19.	Liberación de fenilalanina en hidrolizados enzimáticos de leche descremada (T=45°C).	95
20.	Liberación de fenilalanina en hidrolizados de caseinato de sodio.	97
21.	Condiciones de uso del carbón activado DGR 8x30 para la adsorción de fenilalanina.	99
22.	Retención de fenilalanina por adsorción en diversos hidrolizados de leche descremada.	100
23.	Adsorción de algunos aminoácidos a partir de diversos hidrolizados de leche descremada.	101
25.	Adsorción de aminoácidos por carbón activado DGR 8x30 sobre hidrolizado de caseína con Amano 2A-Papaína.	103

26.	Caracterización de la columna cromatográfica.	104
27.	Caracterización de la placa.	119
28.	Valores de "Rf" obtenidos en la cromatografía en placa para los hidrolizados ácidos y enzimáticos.	121
29.	Comparación del patrón de aminoácidos indispensables en el producto desarrollado contra el recomendado por FAO y el de productos comerciales.	122
30.	Patrón de aminoácidos del producto desarrollado posterior a la adición de aminoácidos perdidos en el proceso de adsorción.	124
31.	Formulación base de un alimento para niños recién nacidos.	125
32.	Formulación propuesta del alimento.	125
33.	La elaboración del producto desarrollado en este proyecto.	128
34.	Pronóstico de demanda del alimento bajo en fenilalanina para el período 1990-1997.	129

INDICE DE FIGURAS

1.	Reacción de hidroxilación de la fenilalanina.	23
2.	Metabolismo de fenilalanina y de tirosina.	23
3.	Degradación de fenilalanina a cuerpos fenilcetonicos y degradación de tirosina a ácido fumárico.	24
4.	Las constantes de primer orden ($X10^3 \text{ min}^{-1}$) para la hidrólisis de a) leucilglicina, b) glicileucina c) glicileucilglicina con HCl 2N a 94.5°C.	30
5.	Inversión de glicivalina a valilglicina y la consecuente formación de una dicetopiperazina en HCl 0.1N.	33
6.	Interconversión del grupo carboxílico en estructuras <i>alfa</i> -aspartil, <i>beta</i> -aspartil y <i>alfa-beta</i> -aspartil en HCl 12N a 37°C por 2 días.	34
7.	Transformación del grupo <i>amino</i> -terminal de glutamina a un anillo de ácido carboxílico de pirrolidona.	34
8.	Mecanismo de acetilación de un aminoácido activo para obtener un aminoácido racémico.	39
9.	Representación gráfica de una cinética química de a) orden cero y b) primer orden.	43
10.	Efecto del pH y de la temperatura en una reacción catalizada por enzimas.	47
11.	Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten.	47
12.	Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de Michaelis-Menten.	48
13.	Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética competitiva. a) con inhibidor y b) sin inhibidor.	49
14.	Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de la clásica inhibición no competitiva.	50
15.	Resultado típico de un análisis parcial de aminoácidos por HPLC.	91
16.	Resultado típico de un análisis total de aminoácidos por HPLC.	92
17.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:1) Albúmina sérica bovina (PM 67,000), 2) Triptofano (PM 204.23).	106

18.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de: 1) tirosil-tirosil-tirosina (PM 507.57).	107
19.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M pH 8.5 de: hidrolizado ácido con 1 hora de hidrólisis, 10 g caseína/100 ml HCl 6N.	110
20.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M pH 8.5 de: hidrolizado ácido con 2 horas de hidrólisis, 10 g caseína/100 ml HCl 6N.....	111
21.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M pH 8.5 de: hidrolizado ácido con 3 horas de hidrólisis, 10 g caseína/100 ml HCl 6N.....	112
22.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M pH 8.5 de: hidrolizado ácido con 4 horas de hidrólisis, 10 g caseína/100 ml HCl 6N.....	113
23.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.05M pH 8.5 de: hidrolizado ácido con 5 horas de hidrólisis, 10 g caseína/100 ml HCl 6N.	114
24.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M pH 8.5 de: hidrolizado ácido con 6 horas de hidrólisis, 10 g caseína/100 ml HCl 6N.....	115
25.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de: hidrolizado ácido con 7 horas de hidrólisis, 10 g caseína/100 ml HCl 6N.....	116
26.	Patrón de elución con piridina 1M, NaCl 0.5M pH 8.5 de: hidrolizado enzimático con 20 horas de hidrólisis de 100 g de caseína, con 1 g de Amano 2A y 2 g de Papaína como enzimas.	117
27.	Patrón de elución con piridina 1M NaCl 0.5M pH 8.5 de: hidrolizado enzimático con 20 horas de hidrólisis de 100 g de caseína, con 1 g de Amano 2A y 2 g de Papaína como enzimas y tratado con 2.95 g de carbón activado.	118
28.	Diagrama a bloques del proceso propuesto.	130

1.RESUMEN GENERAL

El presente trabajo describe la elaboración de un alimento con bajo contenido de fenilalanina obtenido por hidrólisis enzimática, seguida de la separación de la fenilalanina por medio del tratamiento con carbón activado. De igual forma se caracteriza un hidrolizado ácido de caseína que se propone como alternativa para la liberación específica de fenilalanina en proteínas. Esta investigación forma parte del Programa Nacional de Prevención del Retraso Mental de Origen Metabólico y su objetivo específico es satisfacer la demanda de alimentos por parte de los recién nacidos en los cuales se manifiesta la enfermedad "Fenilcetonuria", causada por la deficiencia en la enzima fenilalanina hidroxilasa. De igual forma este trabajo forma parte de un desarrollo tecnológico completo hasta nivel planta piloto, realizado en la Facultad de Química y en el Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología

2 INTRODUCCION

La fenilcetonuria es una de las enfermedades hereditarias que médicamente se conocen como hiperfenilalaninurias, debido a algún defecto enzimático en alguna zona del proceso de hidroxilación de la fenilalanina (*Velázquez, 1987*).

La fenilcetonuria es causada por una deficiencia en la actividad de la enzima fenilalanina-4-hidroxilasa que participa en la *para*-hidroxilación del aminoácido. Su manifestación clínica es un severo retraso mental así como otros trastornos neurológicos (*Cederbaum, 1984*).

Las investigaciones realizadas hasta la fecha involucran la bioquímica de la fenilcetonuria, el diagnóstico y el tratamiento oportuno, a fin de prevenir el retraso mental que conlleva a efectos emocionales graves no sólo para el enfermo, sino también para la familia, a un alto costo para la sociedad.

En México no se ha estudiado aún un número lo bastante grande de recién nacidos como para conocer con exactitud la frecuencia de la fenilcetonuria. Entre 1975 y 1977 gracias a una colaboración entre el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. y la entonces Secretaría de Salubridad y Asistencia, se realizó el programa de tamiz neonatal que consistía en tomar gotas de sangre del talón del bebé recién nacido en una tarjeta de papel filtro y analizar el contenido de aminoácidos. Se detectaron a dos pacientes entre treinta y seis mil recién nacidos estudiados. A causa del cambio de la administración pública se interrumpió el programa, reanudándose en 1986.

Se sabe que la detección y el tratamiento son sumamente costosos, pero más costoso es no realizar el diagnóstico y el tratamiento de los niños fenilcetonúricos desde su nacimiento (*Lenhinger, 1986*). *Velázquez (1987)* calculó que en México, el costo para realizar el estudio para la detección de un caso de fenilcetonuria en 10,000 niños recién nacidos, sería de \$5,000 dólares, sumando \$7,100 dólares del tratamiento con la dieta alimenticia especial durante los primeros ocho años de su vida. Si a esto se le agregan \$19,200 dólares por concepto de la escuela especial y la atención médica durante los 20 años de vida promedio de un fenilcetonúrico, se llegaría a \$31,300 dólares gastados sin haber puesto un remedio al avance de la enfermedad. Por otro lado en la detección y el tratamiento oportuno se gastan solamente \$7,100 dólares.

Como consecuencia de lo antes expuesto, quedó constituido el Programa Nacional de Prevención del Retraso Mental que se realiza a través de un trabajo conjunto entre la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.), la Secretaría de Salud (S.S.), el Instituto de Seguridad y Servicio Social para los Trabajadores del Estado (I.S.S.S.T.E.), los Servicios Médicos del Departamento del Distrito Federal, así como las Secretarías de la Defensa y de Marina. Hoy en día el programa es financiado con fondos de la U.N.A.M., de la S.S., de la Administración del patrimonio para las investigaciones Biomédicas (U.N.A.M.), de la Beneficencia Pública y del C.O.N.A.C.Y.T. El programa tiene como sede el Departamento de Genética de la Nutrición del Instituto Nacional de Pediatría en la Ciudad de México, donde se lleva a cabo la implementación institucional de la prueba de detección de la enfermedad y el seguimiento de los casos positivos.

El proyecto "Producción de un alimento Bajo en Fenilalanina" se desarrolla desde 1987 en el Departamento de Alimentos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química y en el Centro de Investigación Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología como una aportación al Programa de Prevención de Retraso Mental.

El proyecto está contemplado en varias etapas a fin de desarrollar un proceso para obtener un producto para ser suministrado a niños que padecen fenilcetonuria.

La primera etapa consistió en seleccionar una proteína base, llevar a cabo una hidrólisis enzimática extensa y realizar la separación de la fenilalanina del hidrolizado (Lara, 1988).

La segunda etapa consiste en efectuar la formulación del producto terminado, una evaluación económica preliminar y pruebas a nivel planta piloto, lo que se efectúa actualmente (López, 1989).

Una etapa complementaria es explorar la hidrólisis ácida para la liberación de fenilalanina en lugar de la hidrólisis enzimática en proteínas.

Así mismo, los diferentes estudios de la hidrólisis ácida, de la hidrólisis enzimática y de la separación de la fenilalanina del hidrolizado, constituyen una actividad de apoyo al proyecto.

3 GENERALIDADES

3.1 FENILCETONURIA: ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El estudio de la fenilcetonuria data de 1934, año en que Asbjorn Folling trabajaba en el Instituto de Fisiología Veterinaria en la Universidad de Oslo; se presentó una madre con dos niños con retraso mental para efectuarles diversos estudios. Al realizar el análisis rutinario de orina, observó que al agregarle cloruro férrico, aparecía un color verde que minutos más tarde desaparecía, comenzando así, el problema de aislar e identificar la nueva sustancia que provocaba estas reacciones. Folling observó la enfermedad en hermanos en cuatro familias y consideró que era hereditaria como un carácter recesivo (*Bickel, 1980*).

En la primera década de su estudio, de 1934 a 1944, el ácido fenil-láctico fue descubierto en la orina y se contribuyó a explicar la genética de la enfermedad, las primeras anomalías electroencefalográficas y cambios epilépticos.

En la segunda década, de 1944 a 1954, la investigación fue caracterizada por avances importantes en el conocimiento de los aspectos químicos de la fenilcetonuria. Se demostró que la ruta metabólica de la fenilalanina es a través de una para-hidroxilación para convertirla en tirosina.

En 1953, se describió el sistema enzimático y se explicó que la inactivación de la enzima que hidroxila en posición *para*, provoca la fenilcetonuria, hallazgo que ayudó a simplificar la reacción de hidroxilación.

La introducción de nuevos métodos analíticos, microbiológicos, espectroscópicos y cromatográficos, aclararon las anomalías bioquímicas de la fenilcetonuria, así como el metabolismo de la tirosina a triptofano y sus aminas.

En la tercera década, de 1954 a 1965, los descubrimientos de Folling incluyen el desarrollo de la detección y el tratamiento de la enfermedad.

Para el tratamiento fueron desarrollados productos con bajo contenido de fenilalanina. Se reconoce a Bickel y sus colaboradores como los pioneros en la preparación de una dieta para el tratamiento de la fenilcetonuria a partir de un hidrolizado ácido de caseína, del cual retiraron la fenilalanina por medio de adsorción con carbón activado, técnica descubierta por químicos alemanes. Posteriormente se formuló una mezcla artificial de aminoácidos que también permitió mantener en niveles normales la concentración de fenilalanina en la sangre de niños fenilcetonúricos.

A partir de lo anterior, se han desarrollado alimentos para niños fenilcetonúricos. Algunas patentes dedicadas a la producción de alimentos para el tratamiento de la fenilcetonuria, se presentan en la **tabla 1**.

En 1970, se llegó a la conclusión de que debe de iniciarse el tratamiento dentro de los tres primeros meses de edad para evitar retraso mental y daño irreversible al cerebro.

TABLA 1
ALIMENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE FENILCETONURIA

Principio Básico	Patente	Clave	Fecha
Hidrólisis Ácida Parcial (11_3PO_4) e Hidrólisis Enzimática (Enzimas Pancreáticas y Digestivas)	DD 262,674	CIC12P21/06	07-Dic-88
Uso de Proteínas Sintéticas	EP 285,675	CIC12N15/00	12-Oct-88
Hidrólisis Enzimática	JP 61 68,426	CIA61K37/18	08-Abr-86
Uso de Fenilalanina Amonio	WO 85 3,230	CIA61K37/56	01-Ago-85
Liasa			
Uso de Proteínas con Bajo Contenido de Fenilalanina	JP 59 5,111	CIA61K9/08	12-Ene-84
Hidrólisis Ácida (HCl)	DD 157,258	CIC07G7/00	27-Oct-82
Uso de Proteínas con Bajo Contenido de Fenilalanina	CS 190,178	CIA61K31/70	15-Sep-81
Mezcla de Aminoácidos	UK 2,038,629	CIA61K31/195	30-Jul-80
Hidrólisis Enzimática	US 4,209,531	CIA61K31/195	13-Sep-78
Hidrólisis Ácida	DD 147,615		
Hidrólisis Ácida	DD 211,337		
Hidrólisis Ácida	DD 700,966		
Uso de Proteínas con Bajo Contenido de Fenilalanina	DE 2,117,243		
Hidrólisis Enzimática	JP 51 82,791		
Uso de Fenilalanina Amonio	JP 58 86,082		
Liasa			
Uso de Fenilalanina Amonio	JP 73 24,748		
Liasa			
Uso de Proteínas con Bajo Contenido de Fenilalanina	NL 66 11,028		
Principio Básico Uso de péptidos bajos en fenilalanina		Referencia Enzyme 1987, 38 (1-4), 321-7	

En 1968, en los Estados Unidos se desarrolló un estudio con 129 pacientes normales con una edad promedio de seis años. El estudio sugirió que el nivel normal de fenilalanina en sangre es de 5 a 10 mg/100 ml de sangre, dosis en la que no se sufre daño alguno, sin embargo, para algunos investigadores esto pareció una conclusión algo prematura. Considerando el valor mayor en el rango del nivel en sangre y que un

aumento de ese valor puede causar una disfunción cerebral del paciente cuando tiene mayor demanda intelectual, emocional y conductal, se acordó que lo mejor sería definir el rango en niveles más bajos, es decir de 1 a 4 mg de fenilalanina/100 ml en sangre, para niños con fenilcetonuria, hasta no demostrar lo contrario. También se observó que en ciertas etapas del desarrollo los pacientes requieren una mayor cantidad de fenilalanina y de los demás aminoácidos. Así, si se suministraba de 25 a 27 mg de fenilalanina por Kg de peso al día, en forma constante, cuando aumentaba la demanda, se detenía el crecimiento y se presentaba aminoaciduria.

Durante muchos años se ha discutido sobre la edad a la cual se debe suprimir la dieta baja en fenilalanina, al respecto se sugiere un rango de 12-15 años, evitando así la melanización del cerebro durante la pubertad.

Una incógnita sobre el tratamiento dietético en la actualidad, es cuándo y cómo administrarlo a mujeres fenilcetonúricas embarazadas, para prevenir al feto de lesiones como microcefalea, retardo en el crecimiento, cambios neurológicos y malformaciones en el corazón, huesos, ojos y otros órganos, malformaciones que se presentan sobre todo entre la tercera y sexta semana de gestación (*Bickel 1980*).

3.2 ALIMENTOS BAJOS EN FENILALANINA

La fenilcetonuria puede ser tratada si se descubre en el recién nacido y se le mantiene bajo una dieta controlada en fenilalanina durante los primeros años de su vida, el paciente puede así desarrollarse y llegar a ser un adulto normal.

Para una dieta controlada se cuenta con dos productos alternativos:

1. Una mezcla de L-aminoácidos puros, productos que resultan de un alto costo debido a la poca disponibilidad de algunos aminoácidos. El producto es complementado con carbohidratos, vitaminas y minerales sin llegar a ser un alimento completo.

2. Un producto obtenido por hidrólisis de proteínas por acción enzimática o acción ácida, para luego retirar la fenilalanina con un adsorbente como el carbón activado. El hidrolizado es complementado con los aminoácidos perdidos en el proceso, carbohidratos, grasas, minerales y vitaminas para considerarse como la fuente proteica principal del fenilcetonúrico.

3.2.1 Mezcla de L-aminoácidos

Existen en el mercado diversos productos preparados a partir de mezclas de L-aminoácidos, los más conocidos son: PHENYL-FREE (marca registrada de Mead Johnson) y MILUPA PKU-1 y MILUPA PKU-2 (marcas registradas por MILUPA A6 en Alemania Occidental), a continuación se da una descripción de ellos.

A) PHENYL-FREE

Por ser una mezcla de aminoácidos, carece de fenilalanina, por lo que se pueden consumir otros alimentos que contengan pequeñas cantidades de fenilalanina y que ayuden a complementar las necesidades nutricionales del infante, es consumido por niños de 2 a 13 años, su análisis proximal se muestra en la **tabla 2** (Anónimo, 1986a).

TABLA 2

ANÁLISIS PROXIMAL DE PHENYL-FREE. (Anónimo, 1986a).

COMPONENTE	g/100 g de POLVO
Equivalente de proteína (N*6.25)	20.3
Grasa	6.8
Carbohidratos	66.0
Minerales (cenizas)	3.8
Humedad	3.2

B) MILUPA PKU-1 Y MILUPA PKU-2

Los productos MILUPA PKU-1 y MILUPA PKU-2 son mezcla de L-aminoácidos que además contienen vitaminas, minerales, elementos traza y cantidades mínimas de sacarosa. Los dos carecen de fenilalanina y se asemejan a la composición de aminoácidos patrón de la leche materna, pero aún son productos incompletos, por lo que tienen que ser complementados con alimentos que contengan carbohidratos, grasas y fenilalanina, pero cuidadosamente controlados (Anónimo, 1980).

Los productos MILUPA presentan ciertas desventajas:

1. No son muy aceptados por tener un sabor fuerte y un olor desagradable.
2. El consumo no debe exceder de 1 mmol/Kg/día de cisteína y metionina en el organismo, ni la cantidad de cationes Na^+ y K^+ debe ser superior a la cantidad de iones Cl^- porque puede provocar una acidosis metabólica y de hecho, los niños que son alimentados con este producto sufren anorexia y

vómito. En la **tabla 3** se presentan las composiciones de ambos productos.

TABLA 3
COMPOSICION DE LOS ALIMENTOS: MILUPA PKU-1 Y MILUPA PKU-2.

(Anónimo 1980).

NUTRIMENTO	MILUPA PKU-1 (%P/P)	MILUPA PKU-2 (%P/P)
Aminoácidos	66.30	80.10
Sacarosa	17.60	7.10
Humedad	5.20	3.50
Kcalorías	272.00	295.00
Vitaminas	1.29	0.70
Minerales	9.84	5.46

3.2.2 Hidrolizados proteicos

El producto LOFENALAC (marca registrada por Mead Johnson) (Acosta, 1977), es un hidrolizado enzimático de caseína, adicionado de carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales, siendo un alimento nutricionalmente completo, su fórmula y composición se muestran en la **tabla 4**.

Se observa que por su bajo contenido de fenilalanina se pueden consumir otros alimentos para cubrir las necesidades nutricionales del fenilcetonúrico y permitir así que el niño se relacione con el sabor y la textura de los alimentos (Anónimo, 1986b).

Sin embargo LOFENALAC no cumple con la composición de aminoácidos semejante a la de la leche materna, aún tiene un contenido residual de fenilalanina, su

TABLA 4
COMPOSICION DE LOFENALAC (Acosta, 1977).

NUTRIMENTO	VALOR/100 g DE ALIMENTO
Kcalorías	450.00
Equivalente de proteína (g)	15.00
Grasa (g)	18.00
Carbohidratos (g)	57.00
Aminoácidos (g):	
L-arginina	0.34
L-histidina	0.27
L-isoleucina	0.78
L-leucina	1.45
L-lisina	1.58
L-metionina	0.51
L-fenilalanina	0.08
L-triptofano	0.20
L-treonina	0.81
L-tirosina	0.82
L-valina	1.19
Minerales (mg)	2769.50
Vitaminas (mg)	220.00
* hidrolizado de caseína que contiene solamente 0.4% de fenilalanina.	

sabor y olor son desagradables a los niños y adultos, no así a los bebés. Si se consume en exceso causa obesidad en el niño por su alto contenido de grasas y carbohidratos, su solubilidad es baja, teniendo que calentar la mezcla mientras se agita.

3.3 NUTRICION: VALOR NUTRITIVO DE LAS PROTEINAS

Al nacer, los niños pesan en promedio 3Kg y miden 50 cm; a los 5 meses duplican su peso y al año lo triplican y aumentan de 20 a 30 cm de estatura. De los 5 a los 9

meses les aparecen los primeros dientes mientras que a partir del segundo año se modera la velocidad de crecimiento aumentando entre 2 y 3 Kg/año y creciendo de 6 a 8 cm/año hasta la adolescencia (Robinson, 1979), (UTBON, 1983).

Durante los primeros 6 meses, la leche ya sea del seno materno o de la fórmula láctea, satisface las necesidades proteicas y energéticas del niño. Durante el segundo semestre, la leche materna ya no es suficiente y se requiere introducir otros alimentos, tomando en cuenta la necesidad de administrar la la cantidad de proteína necesaria. Entre el primer año y tercer año se tiene la fase peligrosa para adquirir enfermedades y el aumento de peso es irregular y lento. A partir del tercer año hasta alrededor de los diez años, el niño adquiere cierto grado de resistencia a las infecciones y puede ingerir una variedad más amplia de alimentos; así aunque permanezca con pesos y estatura menores de lo normal, empieza a crecer lentamente (Fomon,1976), (White, 1980).

Las proteínas se han clasificado entre otros criterios de acuerdo con su capacidad para mantener la vida y promover el crecimiento. Una proteína completa posee la cantidad suficiente de los aminoácidos indispensables, siendo ésta de alto valor biológico. Tal es el caso de la proteína de huevo, de la carne, de la leche, de las aves y del pescado. La proteína ideal de referencia sería la que por cada gramo de proteína se produciría un gramo de tejido, asignándosele entonces un valor biológico de 100. Una proteína parcialmente completa, logra mantener la vida, pero carece de la cantidad suficiente de aminoácidos indispensables, tal es el caso de la gliadina del trigo. Una

proteína totalmente incompleta, es incapaz de reemplazar o construir nuevos tejidos y por lo tanto no puede conservar la vida ni promover el crecimiento, como son la gelatina y la zeína del maíz (Fisher y Bender, 1976), (Chávez y Metz, 1979).

La calidad, determina entonces la utilidad de una proteína alimenticia para el crecimiento y mantener los tejidos. La cantidad de proteína que se puede sintetizar depende del aminoácido limitante, es decir del aminoácido indispensable que se encuentre en menor concentración. Las proteínas del huevo y de la leche humana tienen todos los aminoácidos presentes en las proporciones adecuadas, siendo aprovechadas íntegramente, por lo que se les asigna un valor biológico de 100 (Williams, 1961), (De Chávez, 1969).

Los aminoácidos se absorben en el intestino proximal a la circulación portal. Las velocidades de absorción son reguladas por mecanismos complejos, que dependen de :

- a) la carga total de aminoácidos liberados por la digestión;
- b) las proporciones de los diversos aminoácidos en la mezcla que será, absorbida;
- c) la disponibilidad de transportadores para llevar los aminoácidos a las células de la mucosa y,
- d) la fijación de aminoácidos en los tejidos.

Todos los aminoácidos que se necesitan para la síntesis de una proteína, deben estar presentes en cantidades suficientes, si falta un sólo aminoácido, la proteína no puede sintetizarse. Si uno de los aminoácidos está en cantidad limitada, sucede lo

mismo y entonces los aminoácidos en exceso, son catabolizados para producir energía. Por esta razón resulta sumamente importante que todos los aminoácidos indispensables se encuentren en la concentración adecuada, sobre todo durante el crecimiento (*Harper y Col., 1978*), (*Wilson, 1978*).

Por otro lado, en el caso de la fenilcetonuria, resulta especialmente importante el controlar la concentración de fenilalanina en la dieta de los niños en crecimiento, y mantener el balance requerido de los 22 restantes.

En la **tabla 5**, se presenta la clasificación de proteínas de acuerdo a su función. De esta tabla se desprende las graves consecuencias que ocasiona una deficiencia en su síntesis, en el funcionamiento del organismo (*Bohinski, 1985*).

TABLA 5
FUNCION DE LAS PROTEINAS (Bohinski, 1978).

Proteínas de defensa natural: por ejemplo, los anticuerpos en la fracción gammaglobulina de la sangre.

Proteínas digestivas: varias enzimas presentes en las secreciones gastrointestinales; catalizan la degradación de los alimentos de la dieta a sustancias más pequeñas.

Proteínas de transporte: hemoglobina, por ejemplo, que transporta el oxígeno en la sangre; muchas otras se encuentran en las membranas celulares que operan en el transporte de sustancias a través de la membrana.

Proteínas sanguíneas: fibrinógeno, por ejemplo, que participa en los procesos de coagulación.

Proteínas hormonales: proteínas que regulan las actividades celulares, tal como la insulina.

Proteínas respiratorias: los citocromos, por ejemplo, que participan en el transporte de electrones a aceptores apropiados como el oxígeno en los organismos aeróbicos; se consideran también como enzimas.

Proteínas represoras: proteínas que regulan la expresión de los genes en los cromosomas.

Proteínas receptoras: varias proteínas que se encuentran en las membranas celulares; luego de unirse a sustancias específicas por el lado exterior de la célula pueden transmitir esa información hacia el exterior.

Proteínas ribosomales: las proteínas en asociación con el RNA forman los ribosomas, los cuales son un agregado multimolecular que participan en la biosíntesis de proteínas.

Proteínas de visión: la rodopsina, por ejemplo, que participa en los eventos moleculares asociados con la visión.

3.3.1 Química de la fenilalanina.

La fenilalanina es uno de los 20 aminoácidos comúnmente encontrados en las proteínas. Fue descubierta por Schulze y Barbieri en 1879 (*Greenstein, 1961*).

La fenilcetonuria es una de las enfermedades de las que médicamente se conoce como hiperfenilalaninemias, debidas a algún defecto enzimático en alguna zona del sistema de hidroxilación de la fenilalanina (*tabla 6*).

TABLA 6
FORMAS CLINICAS Y BIOQUIMICAS DE HIPERFENILALANINEMIAS

(*Cederbaum, 1984*).

NOMBRE	DEFECTO ENZIMATICO	ASPECTOS CLINICOS	FENILALANINA EN SUERO (mg/ml)	SUSTRATOS EN ORINA
fenilcetonuria clásica	fenilalanina hidroxilasa	retraso mental, enfermedades neurológicas. Pérdida de pigmentos y eccema	20	fenilpiruvato metabolitos
hiperfenilalaninemia persistente	fenilalanina hidroxilasa parcial	algunas veces fenotípicamente normal sin terapia	4 - 20	usualmente normal
deficiencia dihidropteridina reductosa	dihidropteridina reductosa	retraso mental, enfermedades neurológicas progresivas y potencialmente fatales	4	fenilpiruvato metabolitos Dihidropteridina elevada
defectos sintéticos de biopterina	defecto enzimático sintético	igual al anterior	4	igual al anterior, además biopterina elevada

La fenilacetoneuria es debida a una profunda deficiencia en la actividad de la enzima fenilalanina-4-hidroxiilasa también llamada L-fenilalanina-4-monooxigenasa que participa en la *para*-hidroxilación de la fenilalanina. Además se requieren tetrahydropteridina, NADPH y oxígeno (**figura 1**) (*Lenhinger, 1986*).

Durante la fenilacetoneuria, los enfermos excretan con la orina (*Cederbaum, 1984*):

1. fenilalanina
2. ácido fenilpirúvico
3. ácido fenilláctico
4. ácido fenilacético (como fenilacetilglutamina)

El exceso de fenilalanina altera el metabolismo de la tirosina y se excretan en la orina:

5. ácido p-hidroxifenilpirúvico
6. ácido p-hidroxifenilláctico
7. ácido p-hidroxifenilacético, como p-hidroxifenilacetilglutamina

En la **figura 2** se muestra el metabolismo general de la fenilalanina y de la tirosina. En la **figura 3** se observan los metabolitos que se excretan en la orina durante la fenilacetoneuria. La fenilalanina es un aminoácido indispensable mientras que la tirosina no lo es. Esto se debe a que la fenilalanina es precursora de la tirosina, pero si la primera se consume en pequeñas cantidades, entonces la segunda se convierte en indispensable.

La tirosina es precursora de las hormonas adrenalina y tiroxina y de la melanina, pigmento negro que existe en la retina, el pelo y la piel bronceada por el sol de las razas

blancas y la piel oscura de las razas de color. Se produce por oxidación de la tirosina mediante la orto-difenoloxidasas (tirosinasas). La oxidación comprende la formación de dihidroxiindol que se polimeriza espontáneamente a melanina (*Mahler, 1971*).

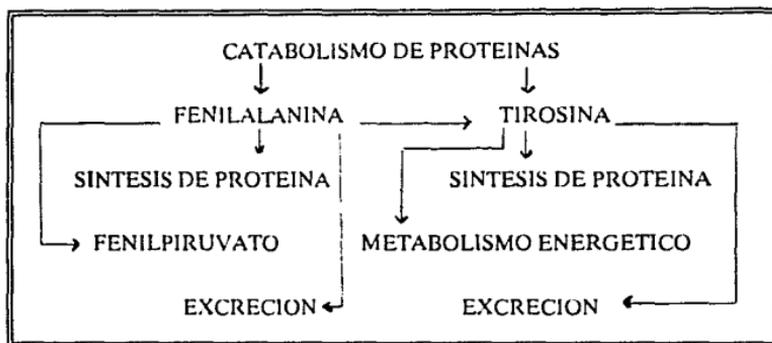


FIGURA 1

REACCION DE HIDROXILACION DE LA FENILALANINA (Cederbaum, 1984).

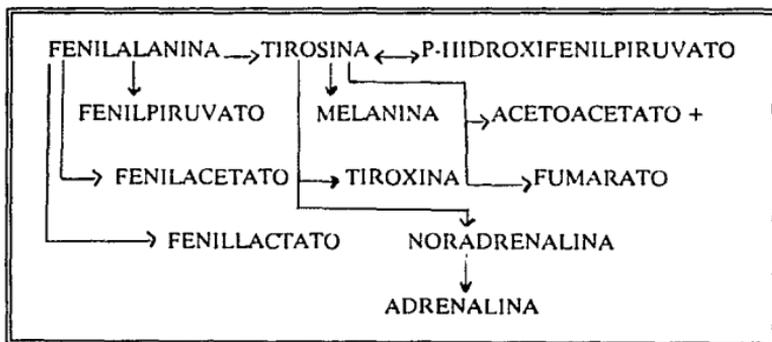


FIGURA 2

METABOLISMO DE FENILALANINA Y DE TIROSINA (Mahler, 1971)

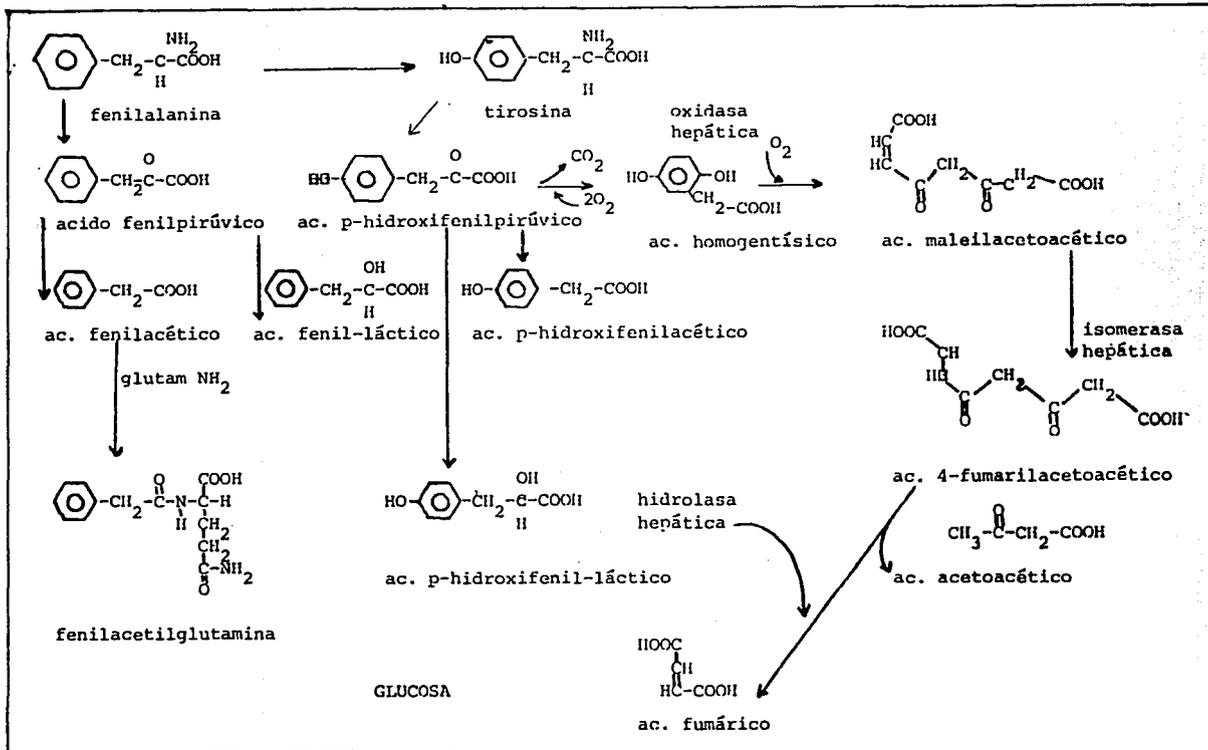


FIGURA 3 DEGRADACION DE FENILALANINA A CUERPOS FENILCETONICOS Y LA DEGRADACION DE TIROSINA A ACIDO FUMARICO

3.3.2 Características de un producto para alimentación de fenicetonúricos.

La base para desarrollar un alimento apto para niños, fenicetonúricos deberá tomar como punto de partida las cantidades de nutrimentos mínimos recomendables necesarios para llenar los requerimientos que permitan un desarrollo adecuado del individuo que lo consuma.

Si se toma en cuenta que lo que se está modificando en este proyecto es la proteína, en principio las características a establecer se restringen a este nutrimento.

En primer lugar, de acuerdo a las disposiciones de la Secretaría de Salud, un alimento para lactantes (de menos de 12 meses) y niños de 1 a 3 años deberá cumplir, en cuanto al contenido de proteína, lo que marca el *Diario Oficial de 1988*, el cual menciona textualmente:

"IV. Proteínas: como mínimo 1.8 g/100 kilocalorías utilizables de proteínas de calidad nutritiva equivalente a la de la caseína, o una cantidad mayor de otras proteínas en proporción a su valor biológico. La calidad de las proteínas no será inferior al 85% de la caseína. La cantidad total de las proteínas no excederá de 4 g/100 kilocalorías utilizables. La calidad de las proteínas deberá determinarse empleando alguno de los métodos biológicos. Podrán añadirse aminoácidos aislados a fin de mejorar el valor nutritivo de la fórmula, para mejorar la calidad de las proteínas, podrán añadirse aminoácidos indispensables únicamente en las cantidades estrictamente necesarias, los cuales deberán ser en su forma "L", de acuerdo a la norma correspondiente."

En cuanto al contenido de cada aminoácido que se debe ingerir, la *FAO (1973)*, recomienda una cantidad mínima de aminoácidos indispensables para cumplir con los requerimientos diarios que permitan un sano desarrollo del individuo (tabla 7).

TABLA 7
REQUERIMIENTOS DE AMINOACIDOS INDISPENSABLES EN EL HUMANO
(*FAO, 1973*)

AMINOACIDO	REQUERIMIENTOS PARA BEBES (0-6 MESES) mg/día/Kg	PATRON IDEAL PROVISIONAL PARA BEBES mg/g proteína
Histidina	28	14
Isoleucina	70	35
Leucina	161	80
Lisina	103	52
Mctionina + Cis	58	29
Fenilalanina + Tir	125	63
Treonina	87	44
Triptofano	17	8.5
Valina	93	47
Total de aminoácidos indispensables	742	372.5
requerimiento total de proteína (huevo o proteína de leche)	2,000	

Por esta razón, un producto con las características requeridas para fenilcetonúricos deberá además cumplir con los criterios anteriores en cuanto al contenido de proteína y aminoácidos.

Por último, la dieta recomendada para niños fenilcetonúricos establece que la ingesta de fenilalanina deberá ser de 20 a 60 mg/día/Kg de peso del niño, para que el

nivel en sangre del aminoácido sea de 3 a 10 mg/100 ml. Si la ingesta de fenilalanina es inferior de 20 mg, el crecimiento se detiene y si es superior de 100 mg sufre retraso mental (Davison, 1979).

3.3.3 Hidrólisis de proteínas

La hidrólisis de proteína se puede efectuar mediante varios procesos (Hill, 1965):

- a) Hidrólisis ácida
- b) Hidrólisis alcalina y,
- c) Hidrólisis enzimática

Los primeros experimentos en hidrólisis ácida de proteínas se realizaron por Branconnot en 1820 a raíz del descubrimiento de los métodos cromatográficos y electroforéticos para examinar los productos de los hidrolizados proteicos, al uso de ácidos y enzimas como agentes de la degradación sistemática de las proteínas y a la separación de enzimas proteolíticas con alta pureza para realizar las hidrólisis selectivas.

Desde un punto de vista experimental, los métodos empleados para la medición de hidrólisis de proteínas se basan, ya sea en la diferencia de solubilidad, en la rotación óptica, en el espectro de absorción y en la precipitación de la proteína hidrolizada.

Otros métodos se basan en las reacciones químicas del producto hidrolizado, es decir, de aminoácidos y péptidos con distintos agentes, después de separar la proteína no hidrolizada. (tabla 8).

TABLA 8
REACCIONES QUIMICAS PARA LA MEDICION DE HIDROLISIS DE
PROTEINAS

METODO	REACTIVO	FUNDAMENTO
Espectrofotométrico	Ninhidrina	Se produce color azul violáceo con los aminoácidos que se leen a 540 nm, excepto la prolina que da color amarillo a 440 nm, Se basa en la ley de Beer.
Espectrofotométrico	Acido fosfo molibdo túngstico	Se conoce como el método de Lowry, para el análisis de proteínas. Se basa en la detección de tirosina, con color azul y obedece la ley de Beer.

Los métodos cromatográficos son técnicas que permiten separar, identificar y cuantificar aminoácidos y péptidos.

La electroforesis es muy valiosa en el aislamiento y la separación de proteínas y en la determinación directa de la mezcla de proteínas o bien de aminoácidos. Se basa en el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico.

3.4 HIDROLISIS ACIDA DE PROTEINAS

Los parámetros que afectan la hidrólisis ácida de proteínas son:

- a) la temperatura
- b) la presión
- c) el tipo de ácido
- d) la concentración del ácido
- e) la concentración de la proteína
- f) la composición de la proteína
- g) la presencia de material no proteico

3.4.1 Especificidad

Los resultados de *Gordon (1941)*, muestran que la hidrólisis ácida parcial tiene cierto grado de especificidad explicándola de la siguiente forma:

Los aminoácidos: glutamina y asparagina, en los inicios de la hidrólisis desprenden en forma de amonio, el grupo amino que les confiere carácter básico.

La serina y la treonina también forman amonio; pero proveniente del nitrógeno *alfa*-amino. El contenido de amonio desprendido es proporcional al contenido de los cuatro aminoácidos anteriores en la proteína.

Existen efectos electrostáticos debido a que las cargas positivas de los grupos NH_3^+ terminales, que repelen a los iones H^+ , hacen al enlace adyacente al grupo, más resistente al ataque ácido, demostrado termodinámicamente. La **figura 4** muestra

las constantes de velocidad para la hidrólisis de enlaces peptídicos. Se nota que en un tri péptido, el enlace más alejado al grupo amino-terminal es el más susceptible a hidrolizarse que el otro (Hill, 1965).

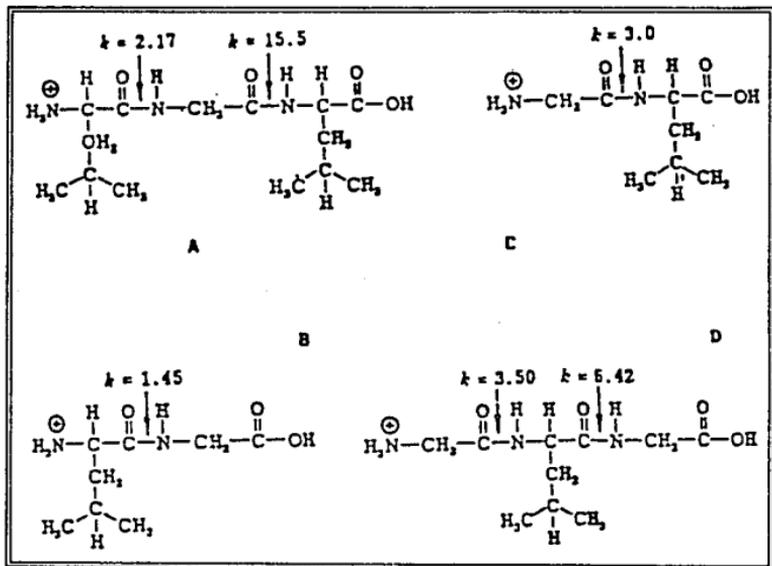


FIGURA 4

Las constantes de primer orden ($\times 10^3 \text{ min}^{-1}$) para la hidrólisis de: a) Leucilglicileucina, b) Leucilglicina, c) Glicileucina y d) Glicileucilglicina en HCl 2N a 94.15°C (Hill, 1965).

El grupo R de los aminoácidos causan efecto estérico. El péptido glicilglicina se hidroliza 70 veces y el péptido valilglicina 25 veces más rápido que los péptidos leucilleucina y leucilriptofano.

Se observa una resistencia a la hidrólisis por el grupo amino-terminal de valina y leucina debido a sus grupos R isopropil e isobutil respectivamente.

En los enlaces formados por serina y treonina que den el grupo amino-terminal se ha demostrado que son muy lábiles al ataque ácido explicándose por una migración acil N-O cuando se usan soluciones ácidas con HCl 12 N 20°C, mientras que en soluciones diluidas en que también son lábiles, no existe explicación alguna.

Los enlaces formados por residuos de aspartil son muy susceptibles a la hidrólisis en ácido diluido debido a las cargas negativas del grupo carboxílico del ácido aspártico que atrae a los iones H^+ , siendo esta susceptibilidad función de la concentración de ácido y no del tipo de ácido (*Hill, 1965*).

3.4.2 Hidrólisis ácida completa.

La hidrólisis ácida completa se puede lograr con: HCl 6N, 110°C, 24 hr, libre de oxígeno, de sustancias no proteicas y de metales. Este proceso de hidrólisis de una proteína es el que se efectúa para conocer la cantidad y composición de sus aminoácidos, excepto triptofano en el analizador de aminoácidos.

Se ha puesto de manifiesto la destrucción de algunos aminoácidos: la glutamina se convierte a ácido glutámico y la asparagina se convierte a ácido aspártico; pero hay métodos que permiten estimar su contenido en la proteína. El triptofano es destruido y produce humina; pero se puede cuantificar mediante una hidrólisis alcalina en la que no es destruido. Hay otros reportes que mencionan que del 5-10% de serina y treonina son destruidos dependiendo del tiempo de hidrólisis y en cantidades pequeñas. Otros aminoácidos son destruidos como la cisteína, el ácido aspártico, la prolina, la tirosina, el ácido glutámico, la arginina y la lisina. Esta destrucción varía en función del tiempo de hidrólisis, de la concentración y composición de la proteína (Hill 1965).

3.4.3 Hidrólisis ácida parcial

La aplicación más importante de la hidrólisis ácida parcial es determinar la secuencia de aminoácidos y la estructura covalente de los péptidos.

La hidrólisis ácida parcial puede hacerse con HCl 12N a 37°C hasta llegar a obtener péptidos, pero debido a la naturaleza tan compleja de la hidrólisis y a las condiciones más suaves de reacción, el rendimiento de algunos péptidos es bajo y la fraccionación de los productos resulta difícil (Hill, 1965).

En la hidrólisis ácida diluida con HCl 0.1N, se verifica una inversión de la glicilvalina a valilglicina y la consecuente formación de una dicetopiperazina, un anhidrido cíclico (figura 5), sin embargo con HCl 12N, 37°C es poca o nula esta inversión.

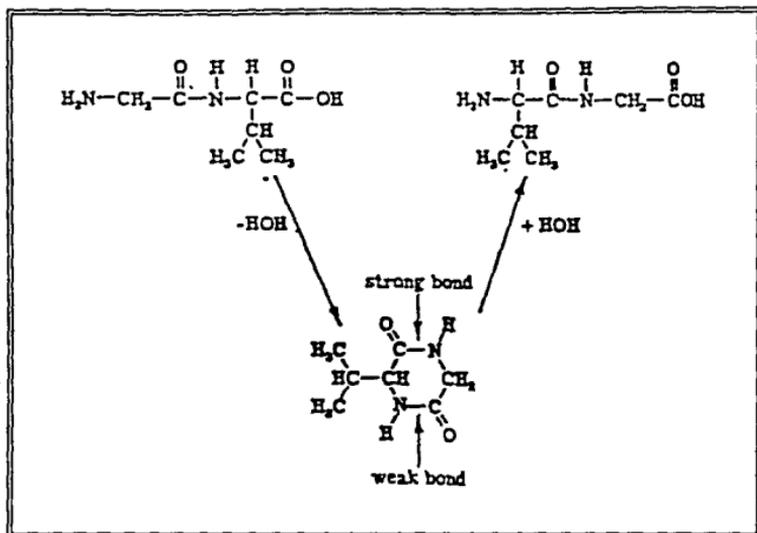


FIGURA 5

Inversión de glicilvalina a valilglicina y la consecuente formación de una diketopiperazina en HCl 0.1N (Hill, 1965).

En péptidos con residuos de ácido aspártico se ha observado una interconversión de su grupo carboxílico en estructuras *alfa*-aspartil, *beta*-aspartil y *alfa-beta*-aspartil (figura 6), cuando se hidroliza proteína con HCl 12N, a 37°C, por 2 días, sin embargo con HCl 5.7N, 100°C por períodos cortos de tiempo, no se detecta.

En valores de pH ácidos ocurre la transformación del grupo amino-terminal de glutamina a un anillo de ácido carboxílico pirrolidona (figura 7).

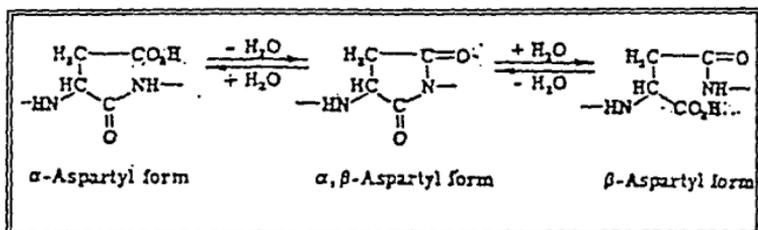


FIGURA 6
 Interconversión del grupo carboxílico en estructuras *alfa*-aspartil, *beta*-aspartil y *alfa-beta*-aspartil, en 11Cl 12N a 37°C por 2 días (Hill, 1965).

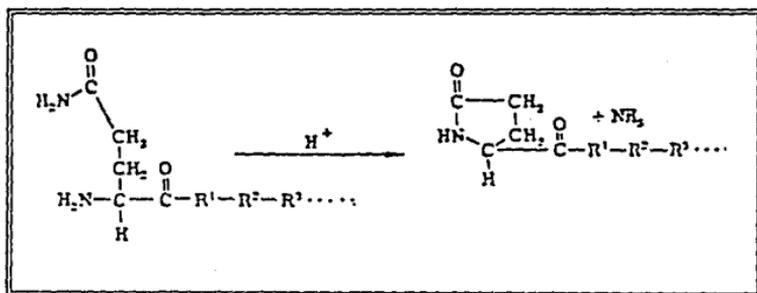


FIGURA 7
 Transformación del grupo amino-terminal de glutamina a un anillo de ácido carboxílico pirrolidona (Hill, 1965).

Sin embargo, las anteriores reacciones de inversión no se han detectado en estudios secuenciales, sino sólo en modelos peptídicos.

En los últimos 40 años se han efectuado una gran cantidad de estudios sobre el comportamiento de la hidrólisis ácida parcial; pero no se han recopilado en publicaciones o libros especializados. Para fines de esta investigación se revisaron publicaciones que tenían como fuente proteica para la hidrólisis ácida a la ovoalbúmina, al gluten, a la leche en polvo y a la gelatina entre otras.

Partridge (1949), aísla la fenilalanina de un hidrolizado de ovoalbúmina que obtienen con el 9.6 g de proteína en 100 ml de HCl al 21.87% a reflujo por 40 hr.

Toshikazu y Col. (1984), hidrolizan una proteína variando la concentración de ácido clorhídrico de 10% a 25% con el 12% en proteína y una temperatura mayor de 160°C.

Harris y Pon (1956), realizan la hidrólisis ácida de una serie de dipéptidos sintéticos con ácido clorhídrico 2N a 99°C, para determinar sus constante de velocidad. Asimismo determinan sus valores de "Rf" en cromatografía en capa fina, con una mezcla de solventes: butanol-ácido acético-agua (4:1:5).

Marecek y Kozich (1956), estudian algunas proteínas para conocer la labilidad de los enlaces peptídicos con HCl 10% a 20%

Nakazima e Ikeda (1941), realizan hidrólisis de caseína y gelatina a altas temperaturas y presiones por 4 a 5 horas en agua y en HCl 20%.

Gordon y Col. (1941), efectúan hidrólisis de gelatina con ácido clorhídrico concentrado a 37°C por una hora, obteniéndose 1/3 del hidrolizado en forma de aminoácidos libres y encuentran la preferencia de la ruptura en los aminoácidos básicos.

Zhigulov (1949), compara la hidrólisis ácida de gluten y de la proteína de la carne con HCl 16% y HCl 7%. Para el gluten observa que la hidrólisis es de 5 a 6 veces más rápida con HCl 16% que con HCl 7%. Para la proteína de la carne, observa que la hidrólisis es 10 veces más rápida con HCl 16% que con HCl 7%.

Hull (1949), estudia la influencia de la presión, de la temperatura y del pH en la hidrólisis de gluten.

Strocchi (1954), estudia el efecto de la concentración de ácido en la hidrólisis de caseína, notando que el HCl 26% es ligeramente más poderoso que el HCl 20%, notándose en el incremento del grupo *alfa*-amino libre en los hidrolizados.

Karambelkar, Ramasarma y Sreenivasan (1950), tratan una proteína a una presión de 40-100 atm de CO₂ en autoclave a 100-300°C en presencia de Sn o Ti como catalizador.

Mondolfo y Camboni (1950), produjeron hidrolizados enzimáticos con el fin de liberar 18 aminoácidos. Cuando las hidrólisis se realizaron con HCl 3N por 8 horas a 120°C se liberaron: alanina, arginina, glicina, glutamina y prolina, mientras que con HCl 8N por 8 horas a 100°C obtuvieron isoleucina, histidina, leucina y valina, como

aminoácidos libres.

3.4.4 Racemización

Para conocer la actividad óptica de una muestra, generalmente se emplean los polarímetros. Si la luz gira en el sentido de las agujas del reloj, es dextrorrotatoria y se le asigna con (+) ó D. Si por el contrario, la muestra hace girar el plano de la luz polarizada en sentido opuesto al de las agujas del reloj, se dice que es levorrotatoria y se designa como (-) ó L.

Los estereoisómeros que guardan entre sí la relación de imágenes superponibles se denominan enantiómeros y estos giran el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas, pero con magnitudes iguales.

La quiralidad es un prerequisite para la existencia de actividad óptica, sin embargo, los compuestos quirales no son necesariamente ópticamente activos. De acuerdo al sistema de Cahn-Ingold-Prelog, los compuestos (+) son (R) (rectus, derecha) y los (-) son (S) (sinister, izquierda). Una mezcla racémica (DL-) es un complejo molecular de las formas D y L que se produce durante la síntesis química (Mazur y Harrow, 1973).

Los diastereómeros son moléculas con dos o más centros quirales y no son necesariamente quirales; así, las moléculas con centros quirales, pero que son aquirales, se conocen como compuestos meso y poseen un elemento de simetría.

En todos los aminoácidos de origen natural, excepto la glicina, el carbono "alfa" es asimétrico y las sustancias son ópticamente activas. La serina se toma como referencia para clasificar a los aminoácidos de acuerdo con su configuración, perteneciendo a la familia L, al igual que el L-gliceraldehído. Todos los aminoácidos, excepto la cisteína, poseen la configuración absoluta (S).

Los aminoácidos: cisteína, hidroxiprolina, ácido *beta*-hidroxiglutámico, treonina e isoleucina, poseen dos carbonos ópticamente activos por lo que tienen cuatro estereoisómeros posibles los D, los L, el racémico y el meso.

La cisteína inactiva (racemato con partes iguales D y L) por primera vez fue preparada por Hoffman y Gortner en 1922 teniendo a la L-cisteína en reflujo con ácido clorhídrico concentrado por largo tiempo, pero no pudo demostrarse sino hasta años más tarde cuando se aislaron las diferentes formas de la cisteína.

De hecho la racemización de los aminoácidos ocurre durante una hidrólisis de proteínas, pero no se tiene conocimiento de las condiciones de hidrólisis en que se pueda evitar o minimizar en todos o ciertos aminoácidos, sólo se sabe que con un álcali son fácilmente racemizados, disminuyendo la rotación óptica específica hasta ser de cero. Algo similar ocurre con las idantoínas cuando son tratadas con álcalis diluidos. Los aminoácidos obtenidos de ellas son ópticamente inactivos (**figura 8**) (*Schmidt, 1944*).

Las series L y D de los aminoácidos difieren en sabor; en la serie L los aminoácidos son amargos o sin sabor, mientras que en la serie D son de sabor dulce. (*Meister, 1965*).

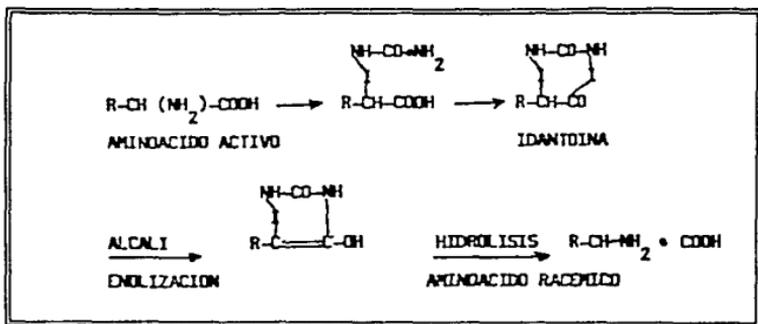


FIGURA 8
 Mecanismo de acetilación de un aminoácido para obtener un aminoácido racémico.
 (Schmidt, 1944).

3.5 HIDROLISIS ENZIMATICA

La propiedad fundamental de una enzima es el de ser una proteína que aumenta la velocidad de una reacción y se caracteriza por tres puntos que la distinguen de los catalizadores químicos (Whitaker, 1972):

1. Son catalizadores muy eficientes.
2. La mayoría de las enzimas se distinguen por su especificidad de acción ya sea sobre algún tipo de enlace o bien por un sustrato determinado.
3. La actividad de las enzimas está sujeta a regulación: por pH, por temperatura, por inhibidores o por el mismo sustrato.

En 1923, James Summer aisló la enzima ureasa y desde entonces, se han aislado más de 2,000 enzimas. Tan sólo en 25 se ha determinado la estructura tridimensional, empleándose la difracción de rayos X.

Las enzimas se clasifican con base en el tipo de reacción química que catalizan, siendo seis los grupos existentes. (tabla 9) (Bohinski, 1978).

La habilidad de las enzimas proteolíticas para hidrolizar enlaces peptídicos formados por aminoácidos específicos les dan ciertas ventajas sobre otros agentes hidrolíticos, entre otros:

1. Se obtienen altos rendimientos de péptidos o aminoácidos.
2. Se produce un hidrolizado con un menor tipo de péptidos en condiciones más suaves de reacción.
3. Prácticamente no hay alteración hidrolítica de los productos.
4. Se requiere de una muy pequeña cantidad de enzima.
5. Las enzimas pueden usarse para modificar sustancias biológicamente activas.

Una desventaja podría ser la transpeptidación, que sólo ha sido deducida, pero no identificada y el costo de la enzima, aunque las condiciones de reacción, temperatura y presión relativamente bajas, hace que su uso sea poco costoso.

TABLA 9

RESEÑA PARCIAL DE LA CLASIFICACION SISTEMATICA DE LAS ENZIMAS

(Bohinsky, 1978).

1. **Oxidorreductasas** (reacciones de óxido-reducción de todos los tipos).
 - 1.1 actúan sobre el grupo CH-OH como sustrato.
 - 1.1.1 requieren NAD^+ o NADP^+ como aceptor de hidrógeno.
2. **Transferasas** (reacciones que implican la transferencia de un grupo intacto de átomos de una molécula dadora a una aceptora).
 - 2.1 transferencia de grupos metilos.
 - 2.4 transferencia de grupos glucosídicos.
 - 2.7 transferencia de grupos que contienen fósforo.
3. **Hidrolasas** (reacciones que implican la ruptura hidrolítica de enlaces químicos, tales como C-O, C-N, C-C).
 - 3.1 hidrólisis de enlaces estéricos.
 - 3.2 hidrólisis de enlaces glucosídicos.
 - 3.4 hidrólisis de enlaces peptídicos.
4. **Liasas** (reacciones que implican la ruptura de C-O, C-C, C-N y otros enlaces por otros medios fuera de hidrólisis u oxidación).
 - 4.1 liasas carbono-carbono.
 - 4.2 liasas carbono-oxígeno.
 - 4.4 liasas carbono-azufre.
5. **Isomerasas** (reacciones que implican cualquier tipo de isomerización, tales como racemización, epimerización e isomerizaciones cis-trans).
 - 5.1 racemización y epimerización.
 - 5.2 isomerización cis-trans.
6. **Ligasas** (reacciones que implican la formación de un producto que resulta de la condensación de dos moléculas diferentes acopladas a la ruptura de una unión pirofosfórica del ATP).
 - 6.1 formación de enlaces carbono-oxígeno.
 - 6.2 formación de enlaces carbono-azufre.

3.5.1 Cinética química

Las reacciones químicas se pueden clasificar en monomoleculares, bimoleculares, tri, tetra, etc., según el número de moléculas que interactúan durante la formación del producto (*López-Mungula, 1987*).

Las reacciones se distinguen también por su orden cinético, que se establece de la relación entre la velocidad de la reacción y la concentración de los reaccionantes. Se determina experimentalmente, mediante un ajuste de los datos experimentales en la ecuación de velocidad de la reacción.

Por ejemplo, se tiene una reacción $A \rightarrow B$ donde **A** representa al reaccionante o sustrato y **B** representa al producto. Para ella se puede hacer una expresión matemática que defina la velocidad de la reacción en función de la desaparición del sustrato o de la aparición del producto con respecto al tiempo.

$$V = kA^n = -d[A]/dt = +d[B]/dt$$

V = velocidad de la reacción

k = constante de velocidad que tiene un valor fijo para el sistema bajo una serie de condiciones específicas, cuya única variable es la concentración del sustrato.

n = orden cinético de la reacción

A = concentración de sustrato

B = concentración de producto

Se puede conocer el valor de n , determinando la velocidad de la reacción a diferentes concentraciones de sustrato, e igualmente se puede calcular k .

Cuando $n = 0$ (orden cero) $V = k$, es decir, la velocidad es independiente de la concentración del reaccionante, mientras que cuando $n = 1$ (orden primero) $V = k(A)$, es decir, la velocidad es directamente proporcional a la concentración del reaccionante. (figura 9).

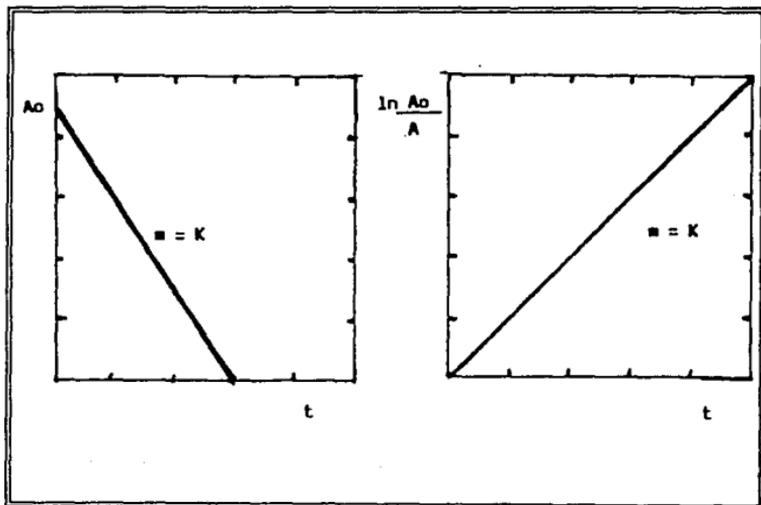


FIGURA 9
Representación gráfica de una cinética química de a) orden cero y, b) primer orden.

La teoría cinética moderna establece que en el paso de sustrato a producto hay un estado de transición que representa un estado activo o de alta energía y que con la velocidad con que se produzca la concentración de la especie activada, determina la velocidad de la reacción y está además controlada por:

- a) la energía de activación que es la diferencia entre el estado de transición y fundamental del sustrato;
- b) por el número de colisiones efectivas que dan energía a las moléculas y,
- c) por el requerimiento de una orientación espacial adecuada de las moléculas participantes.

3.5.2 Cinética enzimática

Al igual que las proteínas, las estructuras conformacionales de las enzimas están estabilizadas por puentes de hidrógeno, uniones iónicas e hidrofóbicas, y en algunos casos enlaces disulfuro. La acción de temperaturas extremas, de disolventes, de condiciones drásticas de pH y fuerza iónica, y de varios agentes químicos, produce desnaturalización de la enzima, lo que origina la pérdida de su actividad; cuando el efecto del agente desnaturalizante no es muy fuerte, la enzima puede nuevamente regenerar su actividad al adquirir otra vez su estructura tridimensional de origen (*Whitaker, 1972*).

A continuación se describe el efecto del pH y de la temperatura en el comportamiento de las enzimas.

Efecto del pH

Con frecuencia, el centro activo de la molécula, tiene grupos ionizables que para lograr una actividad adecuada, deben estar ionizados correctamente por lo que el pH del medio de reacción es de suma importancia.

Existe una desnaturalización irreversible de las enzimas a pH extremos, debido a la pérdida de su estructura espacial por la ruptura de los enlaces covalentes.

El pH en el cual la enzima alcanza su máxima actividad no coincide necesariamente con el pH al que se observa su máxima estabilidad.

El comportamiento que siguen las enzimas se muestra en la **figura 10**.

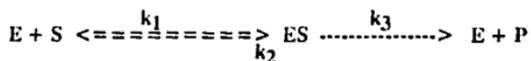
Efecto de la Temperatura

Al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de reacción y se reducen los puentes de hidrógeno, las interacciones iónicas y las fuerzas de Van Der Waals, además surgen interacciones hidrofóbicas por lo que se ven modificadas las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de la enzima.

Así se obtiene un perfil con un máximo de velocidad a una temperatura que se denomina óptima (**figura 10**).

Para comprender la acción enzimática, en 1913, Michaelis y M.L. Menten propusieron una teoría en la que dicen que la enzima E se combina irreversiblemente con el sustrato S para formar un complejo intermediario enzima-sustrato ES, el cual

se descomponía irreversiblemente para producir productos P y la enzima libre en su forma nativa. A cada reacción se le asigna una constante específica de velocidad. (figura 11).



A partir de este mecanismo se obtuvo la expresión:

Donde:

V_0 = velocidad inicial de la reacción

$V_{m\acute{a}x.}$ = velocidad inicial máxima alcanzada

K_m = constante de velocidad

$[S]$ = concentración inicial de sustrato

y donde también:

$$(K_2 + K_3)/(K_1)$$

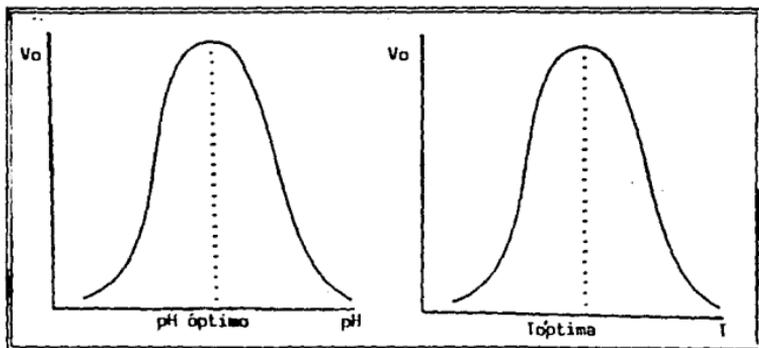


FIGURA 10
Efecto del pH y de la temperatura en una reacción catalizada por enzimas.

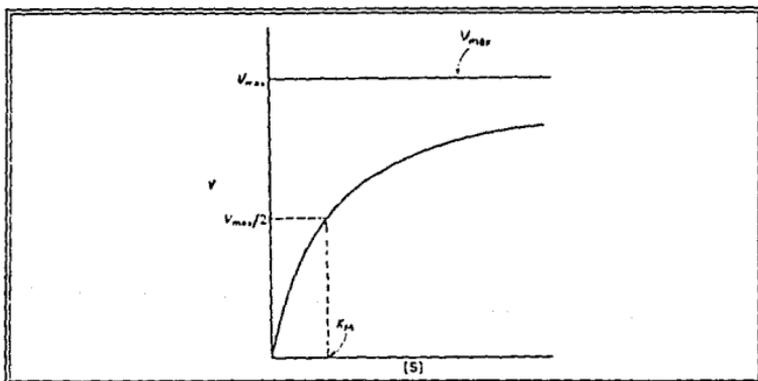


FIGURA 11
Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten.

Además de poder determinar la K_m con la ecuación de Michaelis-Menten, que da un valor estimado, se puede hacer con el gráfico de Lineweaver-Burk que es el recíproco de la ecuación de Michaelis-Menten (figura 12).

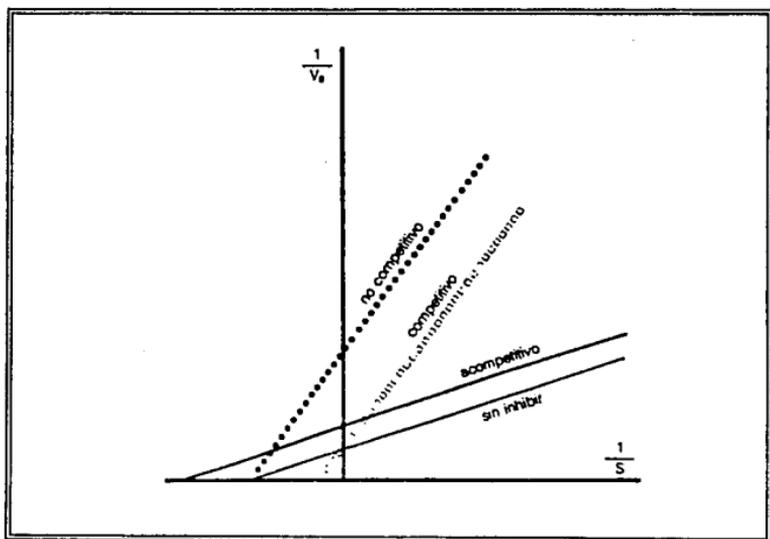


FIGURA 12
Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de Michaelis-Menten.

Durante la reacción enzimática pueden haber sustancias que reduzcan la velocidad de reacción. Llamándose inhibidores, éstos pueden ser entre otros, competitivos o no competitivos.

En la inhibición competitiva, el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo. En la inhibición no competitiva, el inhibidor puede unirse irreversiblemente o reversiblemente a la enzima y puede ser en el sitio activo o en otra zona, por lo que la inhibición no puede disminuirse con la adición de más sustrato. Ambas inhibiciones pueden detectarse mediante un análisis gráfico de los datos de velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato en presencia y ausencia del inhibidor como se muestra en las figuras 13 y 14.

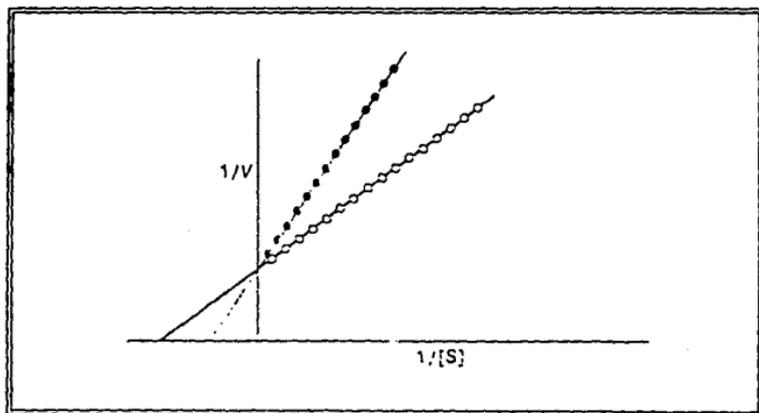


FIGURA 13
Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética competitiva: a) con inhibidor y b) sin inhibidor.

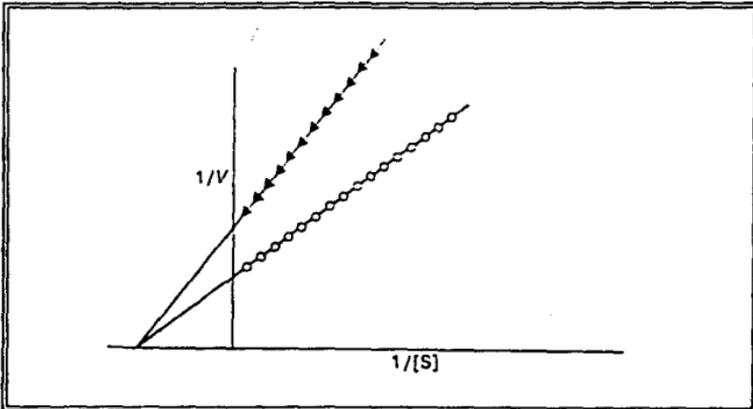


FIGURA 14
Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de la clásica inhibición no competitiva.

3.5.3 Enzimas proteolíticas

Las proteasas, son enzimas muy específicos que gracias a sus propiedades son capaces de favorecer la ruptura de enlaces peptídicos. Pueden reconocer uno o varios sitios de ruptura.

Las endoproteasas son aquellas que atacan en el interior de la cadena, mientras que las exoproteasas atacan en los extremos de la cadena ordenadamente, ya sea por el amino-terminal (aminopeptidasas) o el carboxilo terminal (carboxipeptidasas).

Las características que las distinguen son:

-
-
- a) La naturaleza de los residuos es de importancia ya que para algunas enzimas es importante sólo el amino-terminal o bien el carboxilo terminal.
 - b) Sólo reconocen a los L-aminoácidos.
 - c) El tamaño de la proteína aparentemente no es importante.
 - d) Requieren de un enlace peptídico, aunque la tripsina y otras proteasas también reconocen e hidrolizan el enlace éster.

Ahora bien, las anteriores características están dadas gracias a la configuración espacial del sitio activo y a los residuos laterales del sitio activo que determinan la especificidad.

Según el sitio activo, las proteasas se clasifican en:

1. Proteasas serínicas

Casi todas son endopeptidasas. Contienen serina en su sitio activo. Como ejemplo están la tripsina, la quimotripsina, la subtilisina y la elastasa.

2. Proteasas sulfhídricas

Son de origen vegetal. Contienen el grupo SH en el sitio activo. Participan en reacciones de oxidación-reducción. Como ejemplo se puede mencionar a la papaína, la ficina y la bromelina. Los agentes oxidantes, los alquilantes y los iones metálicos pueden inhibir el sitio activo.

3. Proteasas metálicas

Contienen iones metálicos generalmente en una relación estequiométrica con su molécula. Pueden ser Zn^{+} , Ca^{+} , Fe^{+} , etc. Estas enzimas se inactivan con un agente quelante. Son ejemplo, las carboxipeptidasas A y B.

4. Proteasas ácidas

Se caracterizan por la presencia de grupos carboxílicos en el sitio activo. Ejemplos: pepsina, renina y algunas proteasas microbianas.

Ahora bien, las enzimas proteolíticas también están clasificadas de acuerdo a su fuente de origen.

Así, existen las enzimas proteolíticas de origen animal tanto del tracto gastrointestinal como de los tejidos; las proteinasas vegetales y las proteinasas microbianas (*Hill, 1965*), (*Adler-Nissen, 1986*).

a) Enzimas proteolíticas del tracto-gastrointestinal.

La pepsina fue la primera enzima proteolítica que se conoció, gracias a Spallanzani en 1783 y obtenida en forma cristalina por Northrup en 1930. Es la principal enzima proteolítica del jugo gástrico, se encuentra en casi todos los vertebrados y sus propiedades varían ligeramente en función de su origen. En soluciones fuertemente ácidas es estable, tiene un punto isoeléctrico menor de 1 y se desnaturaliza a valores de pH mayores de 5. Lo mismo que las enzimas proteolíticas del páncreas, la pepsina se sintetiza en forma de un precursor, o zimógeno, llamado pepsinógeno. Tiene un peso molecular de 35,000, es de una sola cadena polipeptídica y es una endopeptidasa.

La renina es una enzima que se encuentra en el cuarto estómago de la ternera y que posee propiedades similares a las de la pepsina.

Se compone de una sola cadena polipeptídica con peso molecular de 40,000 y punto isoeléctrico de 4.5.

El proceso digestivo, iniciado por la pepsina en el estómago, continúa en el duodeno, gracias a las enzimas pancreáticas: La tripsina y la quimotripsina presentándose en el jugo gástrico como zimógenos A y B.

La *alfa*-quimotripsina es una endopeptidasa y cataliza la hidrólisis de ésteres, amidas, hidroxamatos y otros acil-derivados, pero su actividad es máxima cuando la función carboxilo del enlace peptídico procede de un aminoácido aromático.

La tripsina es semejante a la quimotripsina por:

- a) El lugar de origen
- b) La velocidad de síntesis
- c) La actividad endopeptidasa
- d) El peso molecular
- e) El punto isoeléctrico
- f) La composición en aminoácidos
- g) La naturaleza del proceso catalítico

La carboxipeptidasa es una exopeptidasa del jugo pancreático (siendo en realidad una familia de enzimas), degrada los polipéptidos en orden comenzando por el

C-terminal. En la digestión duodenal intervienen las carboxipeptidasa A y B, teniendo la primera la máxima actividad catalítica frente a los radicales aromáticos C-terminales y la segunda es específica para los radicales básicos C-terminales.

La carboxipeptidasa A tiene un peso molecular de 34,000, contiene zinc en proporción de un átomo por molécula de proteína y se le une mediante una función sulfhidrilo específica.

La leucinaminopeptidasa, se encuentra en la mucosa intestinal y en otros tejidos. Es una exopeptidasa que degrada progresivamente las cadenas polipeptídicas por el NH_2 -terminal. El enzima de riñón de cerdo ha sido muy purificada; pero no cristalizada. Los iones magnesio o manganeso la activan, posee actividad esterasa y peptidasa e hidroliza una gran variedad de sustratos. La actividad máxima se presente en el grupo NH_2 -terminal de la leucina.

La mucosa intestinal contiene, además de aminopeptidasas y de carboxipeptidasas, otras muchas peptidasas. Un gran número de estas enzimas son específicas frente a la longitud de la cadena del sustrato, en especial las dipeptidasas y tripeptidasas.

b) Enzimas proteolíticas de los tejidos animales

En los riñones, en el bazo, en el hígado y en el tejido pulmonar entre otros, se localiza intracelularmente un grupo de enzimas proteolíticas, como son las catepsinas que son endopeptidasas. No han sido aisladas lo suficientemente puras para investigarlas.

c) Proteinasas vegetales

La Papaína es una enzima proteolítica del fruto de la *Carica papaya*, una planta tropical, encontrándose muy concentrada en el latex. Consta de una sola cadena polipeptídica, cuya secuencia de aminoácidos se conoce, su peso molecular es de 21,000, y su punto isoeléctrico de 8.75 y no es demasiado específica. Puede hidrolizar péptidos, amidas ésteres y tioésteres.

La ficina, procede de las plantas de la familia de la higuera, es una endopeptidasa con un peso molecular de 26,000. Es una sulfhidrilenzima y su máxima actividad se presenta frente a sustratos derivados de la L-arginina.

Otras enzimas proteolíticas de origen vegetal son la bromelina de la piña, la quimopapaína del latex de la papaya y la asclepaina de las raíces de las euforbiáceas.

d) Proteinasas bacterianas

A partir de las bacterias se han aislado muchos enzimas proteolíticos, los cuales son exo y endopeptidasas y se caracterizan por baja especificidad.

Como ejemplo tenemos a la *Subtilisina BPN'* de la cepa *N'* de *Bacillus subtilis*, la proteasa *B. mesentericus*, la proteasa *B. subtilis*, la proteasa estreptocócica y la proteasa pseudomonadal.

e) Proteinasas fungales

Debido a las fluctuaciones de precio y a la relativa escasez de las proteasas animales, se han buscado sustitutos de origen microbiano. Las proteasas producidas por los hongos *Mucor miehei*, *Mucor pusillus* y *Endothia parasítica*, han sido estudiadas para sustituir a la renina de origen animal en la producción de lácteos, mientras que la enzima fungal de *Aspergillus oryzae* es usada en la industria de la panificación para reducir a la proteína en polipéptidos y aumentar la extensibilidad y viscosidad de la masa (López-Munguía, 1987).

3.6 CROMATOGRAFÍA

En la cromatografía, una mezcla de sustancias que van a ser separadas se aplica en solución a un medio de soporte. Este puede ser papel (cromatografía en papel), una capa de sílice (cromatografía de capa delgada) o una columna rellena con resina adsorbente o de intercambio iónico (cromatografía de columna). Se deja correr por el medio de sostén un solvente revelador y dicho solvente lava junto con él la mezcla de las sustancias aplicadas previamente. Las diferentes moléculas de la mezcla son arrastradas por el lavado a distintas velocidades, con lo cual resulta su separación (Abbot y Andrews, 1965).

El grado de separación depende de cuatro fuerzas que influyen independientemente una de otra, y son:

1. velocidad de flujo del solvente
2. solubilidad de las sustancias en el solvente
3. efectos de fraccionamiento
4. efectos de adsorción

El flujo del solvente es igual para todas las sustancias que componen la mezcla. Si todas las sustancias fueran totalmente solubles, no habría separación; pero es poco probable que sean de la misma solubilidad en un mismo solvente. Si la sustancia es muy soluble, tenderá a moverse más rápido que otra sustancia poco soluble. Así la combinación de la solubilidad es un factor de importancia.

Cuando se usan dos solventes, una sustancia se distribuirá entre los dos solventes en relación a su solubilidad en cada uno. El fenómeno se presenta cuando se usan dos o más solventes que no se mezclan y las diferentes sustancias que componen la mezcla a separar se distribuyen entre los solventes en relación a su solubilidad en cada uno. Esto es muy común en la cromatografía en papel, en capa delgada o en columna.

El fenómeno de adsorción ocurre cuando hay una concentración más alta en la superficie de un sólido que en la superficie y no de penetración como en el caso de la absorción.

Hay cuatro tipos principales de procedimientos cromatográficos (tabla 10), aunque en muchos casos no es posible distinguir entre dos o más de los principios en un método cromatográfico en particular. Por ejemplo, la cromatografía en capa delgada puede involucrar los fenómenos de adsorción y de fragmentación (D. I. Edwards, 1975).

TABLA 10
GUIA DE LOS PRINCIPIOS QUE ACTUAN EN LOS DISTINTOS METODOS
CROMATOGRAFICOS

(D. I. Edwards, 1975).

PRINCIPIO	CROMATOGRAFIA
fraccionamiento	en papel de capa delgada con gas de columna
adsorción	de capa delgada de columna
intercambio iónico	de capa delgada con papel especial de columna
filtración en gel	de columna
de afinidad	de columna

Por lo anterior se puede decir que una técnica es una cromatografía si es un método físico-químico de separación en el cual hay una fase estacionaria y una móvil. La tabla 11 muestra los diferentes métodos cromatográficos con los requisitos que se cumplen para ser técnicas cromatográficas.

Para que un problema sea resuelto eficientemente, hay que estudiar todas las técnicas cromatográficas y usar cuando sea necesario una combinación de ellas y no sólo una.

TABLA II
REQUISITOS DE LAS TECNICAS PARA DENOMINARSE
CROMATOGRAFICAS
(D.J. Edwards, 1975).

PROCEDIMIENTO	FASE FIJA	FASE ESTACIONARIA	FASE MOVIL
en papel	papel	líquido	líquido
en capa delgada	adsorbente	líquido	líquido
H.P.L.C.	empaques	líquido	líquido
gas-líquido	líquido	líquido	gas
filtración en gel	adsorbente	sólido	líquido
adsorción	sólido	líquido	
afinidad	sólido	líquido	

3.6.1 Cromatografía de filtración en gel

Esta técnica de separación consiste en hacer pasar una muestra a través de una columna empacada con gel cuyo grado de entrecruzamiento define el tamaño de las moléculas que lo pueden penetrar. El espacio entre las partículas está ocupado por un líquido que se hace fluir a través del medio cromatográfico (*Fischer, 1975*).

Las sustancias que se van a separar son acarreadas por el flujo del líquido. La fase estacionaria retarda el progreso de las sustancias a través del medio, de esta forma, las moléculas demasiado grandes para penetrarlo, cluyen en primer lugar en el volumen

vacío (V_0), mientras que las demás moléculas lo hacen en orden decreciente de peso molecular, ya que el medio cromatográfico consiste en un gel sin cargas. La determinación del peso molecular se efectúa mediante la cromatografía de filtración en gel.

3.6.1.1 Parámetros usados para caracterizar al lecho cromatográfico.

Para describir un experimento y evaluar los resultados, es necesario seleccionar los parámetros importantes, para poder describir el desarrollo del mismo (*Fischer, 1975*).

En los experimentos cromatográficos, la geometría del medio y la velocidad del flujo son las dos variables más importantes, que determinarán los resultados.

El significado de los términos altura del lecho y diámetro del mismo es lo suficientemente claro y no requiere mucha explicación.

El volumen del lecho cromatográfico (V_t) o volumen total del medio, se calcula a partir de la longitud y diámetro del lecho con la fórmula del cilindro.

El volumen de vaciado (V_0) también llamado volumen del retardo o de espacio muerto, es el volumen del líquido del espacio intersticial entre los granos de lecho, puede determinarse mediante la cromatografía de una sustancia que no sea retardada por el material del mismo y la medición de su volumen de elución.

El volumen del gel en el lecho (V_x) se obtiene por diferencia entre el volumen total del mismo lecho y el volumen del vaciado.

$$V_x = V_t - V_o$$

El volumen interno es el volumen parcial del líquido en la fase del gel (V_i) y se calcula por diferencia del volumen parcial de la matriz del gel del volumen del gel con la fórmula:

$$V_i = V_x - M_g V_g$$

donde:

M_g = peso de la matriz del gel en el lecho.

V_g = volumen específico parcial de la matriz del gel.

También se puede obtener directamente si se conoce el agua recuperada del gel (A_r) con la fórmula:

$$V_i = M_g A_r$$

3.6.1.2 Parámetros usados para caracterizar el flujo

La velocidad del flujo a través del medio cromatográfico, normalmente se mide en cm^3/min ó cm^3/horas (Fischer, 1975).

Cuando se comparan experimentos que se realizaron en las columnas de diferente diámetro, se debe calcular la velocidad de flujo por unidad de la sección transversal del lecho cromatográfico, lo que resulta en la velocidad de flujo en cm/min ó cm/hora.

3.6.1.3 Parámetros usados para caracterizar el comportamiento del soluto

El volumen de elución de una sustancia es el volumen de eluyente que se requiere en promedio para transportar las moléculas de la sustancia a través de la columna. Un detector de ultravioleta por ejemplo, registra a la salida de la columna la elución de proteínas en forma de picos en las diversas fracciones colectadas (*Fischer, 1975*).

Considerando que los picos de elución no son siempre simétricos, se evalúa el volumen de elución dependiendo del tipo de pico. Así se tienen tres formas:

- a) El volumen de eluyente que ha pasado la columna entre la aplicación de la muestra y la elución de la concentración máxima de sustancia, si la curva de elución es simétrica.
- b) Es el volumen eluido desde que se aplica la muestra hasta el punto de inflexión o la mitad de la altura del frente de la curva de elución, si ésta alcanza una meseta.
- c) El volumen de elución se mide desde el punto donde la mitad del volumen de la muestra ha sido aplicado hasta que el máximo de la curva de elución ha sido obtenido.

El volumen relativo de elución (V_e/V_o) no requiere explicación.

La constante de retención (R) es el inverso de (V_e/V_o), se relaciona con las velocidades relativas de migración que caracterizan el comportamiento cromatográfico de las sustancias. Otro parámetro sin nombre que lo distinga es (V_e/V_t).

El coeficiente de partición (K) correlaciona el comportamiento de elución de una sustancia y su coeficiente de partición entre la fase estacionaria y la fase móvil.

Si se supone que el gel completo es la fase estacionaria se aplica:

$$K_{prom.} = (V_e - V_o)/V_x$$

Si sólo se considera al líquido embebido en el gel como la fase estacionaria, se aplica:

$$K_j = (V_e - V_o)/V_i$$

3.6.1.4 Parámetros para caracterizar los geles

Los parámetros usados para caracterizar los geles, son aquellos que están relacionados con las propiedades cromatográficas de éstos. Para ello se hace uso de la relación entre el peso molecular y ($K_{prom.}$) de las proteínas globulares. Estos se grafican en una escala logarítmica en donde el peso molecular está en la abscisa y ($K_{prom.}$) en la ordenada (*Fischer, 1975*).

Debajo de cierto peso molecular, la curva es casi horizontal, en esta zona, todas las sustancias se eluyen juntas en el volumen muerto, teniendo que:

$$V_e = V_o \text{ y } K_{prom.} = 0$$

El límite de exclusión del gel por consiguiente es el punto donde la curva llega a $K_{prom.} = 0$.

El agua recuperada es el volumen de agua embebida en un gramo de gel seco al hincharse, sin incluir el líquido que se encuentra en los intersticios entre los granos.

3.6.1.5 Determinación de pesos moleculares

Para calcular el peso molecular de una sustancia, es necesario asegurar que su paso a través de la columna se lleva a cabo sin restricciones excepto las debidas a su tamaño (Fischer, 1975).

Esta condición se evalúa mediante el cálculo de la variable (K_{av}) que representa la fracción del volumen del gel estacionario que está disponible para la difusión de un soluto dado.

El cálculo de K_{av} se realiza con la ecuación:

$$K_{av} = (V_E - V_o)/(V_t - V_o)$$

Graficando el logaritmo de los pesos moleculares en las abscisas con los valores de (K_{av}) obtenidos al ensayar una muestra conocida, en las ordenadas, se obtiene la ecuación de una recta con la que se puede calcular el peso molecular de una muestra desconocida mediante la interpolación de sus valores experimentales de (K_{av}).

Si el valor de (K_{av}) es mayor de 0.75, está ocurriendo algún tipo de adsorción y si es menor de 0, significa que ha ocurrido un acanalamiento en el gel y es necesario reempacar la columna.

3.6.2 Cromatografía en capa delgada,

El comportamiento cromatográfico depende tanto del adsorbente como del medio de elución. Dentro de ciertos límites, se puede predecir que adsorbente y medios de elución son apropiados para la cromatografía de alguna sustancia determinada (Nuño, 1977).

Los pasos fundamentales de la técnica son:

1. preparación de las placas
2. aplicación de la muestra
3. desarrollo de la cromatografía
4. visualización
5. identificación cualitativa (medición de los valores de R_f con estándares)

6. evaluación cuantitativa (opcional)

- a) medición directa sobre placa
- b) medición por elución

3.6.2.1 Preparación de las placas.

Se utilizan placas de 20 x 20 ó de 10 x 20 ó de 5 x 10 cm, con un espesor de 4 mm. Existen placas preparadas en el comercio con cualquiera de los adsorbentes que se ocupan, siendo los principales (*Niño, 1977*):

silicagel	kieselguhr
alúmina	celulosa

Se utilizan dependiendo de sus características como son:

- caracter neutro, básico o ácido
- capacidad de adsorción
- tipo de cromatografía: adsorción o partición
- naturaleza de la muestra

3.6.2.2 Aplicación de la muestra.

La aplicación debe realizarse con cuidado, mediante una pipeta capilar o jeringa Hamilton, tocando suavemente la superficie de la placa mientras la solución gotea sobre ella sin dañar la capa de adsorbente, de lo contrario pueden producirse manchas distorsionadas y con valores cercanos de R_f si no se separan (*Niño, 1977*).

Los factores que deben considerarse en la aplicación de las muestras son:

1. selección del solvente de la muestra
2. cantidades a ser aplicadas
3. mecanismos de aplicación

La selección del solvente no es de gran importancia, sin embargo debe considerarse que si el solvente es fuertemente adsorbido por el adsorbente, pueden observarse irregularidades cuando la fase móvil pasa por las manchas, distorsionándolas, pero también puede tener ventaja en cuanto a que impide que la mancha se difunda al ser aplicada. El solvente debe ser removido tanto como sea posible. La cantidad de la muestra deberá ser lo suficientemente grande para ser visualizada de manera efectiva y mostrar trazas de impurezas, y lo suficientemente pequeña para dar manchas discretas con un mínimo de coleado.

Las muestras se colocan a 2 cm del final de la placa con separación entre sí de 1 cm y con un diámetro de 0.5 cm. Existen en el mercado la plantilla con su guía de aplicación que lo facilita.

3.6.2.3 Desarrollo de la cromatografía.

En el proceso de desarrollo, el solvente pasa a través de la capa delgada de adsorbente para producir una adecuada separación de los componentes de la mezcla a analizar (Nuño, 1977).

Es conveniente elegir el solvente o mezcla de solventes más idóneo, para lo cual ya existen tablas que los reportan en grupos de compuestos.

Uno de los procesos de desarrollo consiste en colocar la placa en una cámara de desarrollo que contenga 0.5 cm de altura del solvente y que previamente fue saturada del vapor del mismo. Debe dejarse que el frente formado sea de 10 a 15 cm para que halla buena separación.

3.6.2.4 Visualización.

Después de que se desarrolló el cromatograma, la placa se seca y se procede a la visualización de las sustancias incoloras con un agente cromógeno; otros métodos utilizados son:

- | | | |
|-----------|-----------------|----------------|
| -físicos | -radioactividad | -transparencia |
| -químicos | -biológicos | -enzimáticos |

Existen reportes en la literatura sobre los visualizadores para cada tipo de compuestos (*Nuño, 1977*).

3.6.2.5 Identificación cualitativa.

El término "Rf" significa literalmente "relación de frentes" y se usa para expresar la distancia relativa a que se ha desplazado una sustancia. Es una medida física y es característica de un compuesto en determinadas condiciones de solventes y técnicas

usadas (Nuño, 1977).

$$Rf = Xc/Xs$$

donde:

Xc = distancia que viajó el compuesto desde el origen

Xs = distancia que viajó el solvente desde el origen

Por lo que el valor de Rf es menor de 1 y también puede expresarse en valores de porcentaje.

Para identificar los compuestos en una mezcla, se corren estándares de compuestos puros en condiciones idénticas a la mezcla. Con ello se asume que un compuesto de la mezcla que tiene un valor de Rf semejante al valor de Rf de un compuesto puro, es ese mismo compuesto.

El valor de Rf depende de las siguiente variables:

- naturaleza de desarrollo.
- sistema de desarrollo.
- naturaleza y cantidad de la muestra aplicada
- saturación de la cámara.
- sistemas de desarrollo multicomponentes.
- temperatura.

Las coleadas dependen de :

-
- la presencia de especies iónicas.
 - la sobrecarga de muestra.

4 OBJETIVOS

Considerando que la finalidad del presente proyecto es el desarrollar un proceso para obtener un producto para ser suministrado a niños que padecen fenilcetonuria, resulta extenso y requiere de ser realizado por etapas. Entre ellas se distinguen:

1. Elegir la materia prima proteica, en base a los siguientes factores, tales como la calidad nutricional, el costo, la disponibilidad, el porcentaje de proteína y la solubilidad de la misma.
2. Elegir la enzima adecuada para hidrolizar la proteína. La selección de la enzima debe efectuarse teniendo como criterio la liberación de fenilalanina como aminoácido libre.
3. Determinar la forma y las condiciones de separación de la fenilalanina a partir del hidrolizado de proteína con el fin de eliminar este aminoácido.
4. Caracterizar el producto final en cuanto a:
 - a) cuantificación de aminoácidos libres y de la proteína hidrolizada
 - b) determinación del peso molecular de los péptidos obtenidos por la hidrólisis de proteínas.
5. Analizar la eventual posibilidad de utilizar la hidrólisis ácida en lugar de la hidrólisis enzimática para proteínas, considerando que el costo del producto obtenido por hidrólisis enzimática pudiera ser mayor que el costo de un producto ya comercializado.

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 REACTIVOS, EQUIPOS E INSTRUMENTOS

Los reactivos usados fueron grado analítico o cromatografía en el caso de pruebas de laboratorio y grado alimenticio en el caso de pruebas a nivel planta piloto. La **tabla 12** menciona los principales reactivos y materias primas, en la **tabla 13** se enlistan los principales instrumentos y en la **tabla 14** los equipos utilizados en el desarrollo del proyecto.

TABLA 12
LISTA DE LOS REACTIVOS USADOS EN EL PROYECTO

MATERIAL	FUENTE
L-aminoácidos péptidos	Merck ICN Nutritional Biochemicals Sigma Chem. Co. Clarificantes Mexicanos S.A. de C.V.
carbón activado DGR8X30	
enzimas:	Calbiochem.
-Pronasa (grado B)	Amano Int. Enzyme Co. Inc.
-Amano 2A	Hevi, S.A.
-Papaina	ENMEX, S.A. de C.V.
-HT-protcolitic 200	(Producto Francés) LICONSA
leche descremada en polvo	Arancia, S.A. de C.V.
caseinato de sodio	Complementos Alimenticios, S.A.
sólidos de maíz industrializados	Arancia S.A. de C.V.
grasa butírica (99.9% puro)	Producto Neozelandes
grasa vegetal (aceite MAZOLA)	Productos de Maíz, S.A.
L-aminoácidos (grado alimentos)	Ajinomoto, U.S.A.
lecitina	Central Soya, Chemurgy Div.
mezcla de vitaminas VITALAC	Laboratorios Roche
filtrayuda (tipo 4107)	Decalite Mexicana, S.A.
monoestearato de glicerilo	Farmacia Cosmopolita S.A. de C.V.
sales minerales (grado USP)	Farmacia Cosmopolita S.A. de C.V.

* no incluye reactivos utilizados en la caracterización cromatográfica de los hidrolizados.

TABLA 13

INSTRUMENTOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO

equipo de cromatografía HPLC detector de fluorimetría espectrofotómetro termobalanza equipo Kjeldahl Baño control temperatura medidor de pH	WATERS, MOD. 740 WATERS, mod. 420 SHIMADZU, mod. UV-120-02 OHAUS LABCONCO HAAKE mod. F52 BECKMAM mod. 3500
* no incluye los instrumentos utilizados en la caracterización cromatográfica de los hidrolizados.	

TABLA 14

EQUIPOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO DEL PROYECTO

EQUIPO	FUENTE
equipo de reacción enzimática: -bioflow (500 ml) -control de pH -Lh fermentation (13 l)	New Brunswick Sci. mod. C30 New Brunswick Sci. mod. PH22 y 40 Lh mod. 2000 S-I
incubadoras: -enviromental incubator -estufa de incubación	New Brunswick Sci. mod. G-24 RIOSA mod. EC
estufas: -estufa de vacío -estufa de calentamiento -mufla	National Appliances Co. mod. 5831 MAPSA mod. MDP-645 I.IDBUG mod. 51848
centrifugas: -20000 rpm (lab.) -2100 rpm (planta piloto)	DAMON/IEC Div. mod. IEC-HT Mexicana maquinaria mod. 505-SPQ
homogenizadoras	WARRICK Blender SILVERSON
secadores por aspersión	NIRO ATOMIZER
* no incluye el equipo utilizado en la caracterización cromatográfica de los hidrolizados.	

5.2 METODOS GENERALES

1. **Determinación de aminoácidos y péptidos con Ninhidrina:** para la determinación de aminoácidos y péptidos. Se siguió la técnica de Moore y Stein, descrita por *Snell y Snell (1956)*.

2. **Precipitación de proteína con ácido tricloroacético (TCA):** Se siguió la técnica descrita por *Greenberg y Shipe (1979)*.

3. **Método de Folin:** para la determinación de tirosina, se siguió la técnica descrita por *Folin y Ciocalteu (1927)*.

4. **Hidrólisis ácida de proteína:** en ampollitas de vidrio se colocan 1.5 ml de una solución de proteína al 10% en agua y se agregan 2 ml de HCl 6N. Se hace un desplazamiento del oxígeno con nitrógeno durante 20 o 30 segundos. Se hace vacío a la ampollita por 5 o 10 minutos. Se cierra la ampollita a la flama, manteniendo el vacío. Se coloca la ampollita en el horno a 110 °C durante 24 horas. Posteriormente se abre la ampollita y se filtra la solución para retirar el material carbonizado (*López, 1989*).

5. **Análisis bromatológico y microbiológico:** Las determinaciones de proteína y humedad se efectuaron de acuerdo a las técnicas del *AOAC (1975)*, mientras que la determinación de contaminación microbiológica se cuantificó por medio de la técnica cuenta en placa, utilizando el medio de agar bacteriológico (20 g/l) con extracto de

malta (15 g/l). Esta prueba se realiza por quintuplicado. El tipo de microorganismos se determinaron únicamente por observación al microscopio, mediante la técnica de tinción de Gram (AOAC, 1975).

6. Hidrólisis enzimática de leche: En un matraz erlenmeyer de 125 ml se ponen 50 ml de agua y se agregan 8.33 g. de leche (35% de proteína) para tener una solución al 5% (P/V) de proteína. Una vez alcanzada la temperatura de trabajo se agrega la o las enzimas. Se probaron las siguientes combinaciones de enzimas: Amano 2A-Pronasa (AA-PO), HIT Proteolitic-Papaina-Pronasa (HIT-PA-PO), HIT Proteolitic-Pronasa (HIT-PO) y Pronasa (PO).

la enzima Pronasa, denominada comúnmente *Pronase*, es una mezcla de enzimas endo y exoproteolíticas que se obtienen de *Streptomyces griseus*. Esta mezcla tiene la característica de tener muy poca especificidad en su acción sobre los enlaces peptídicos, esto es, muy pocos enlaces peptídicos son totalmente resistentes a la hidrólisis cuando las condiciones son óptimas (Badú, 1988), (Manual del fabricante, 1988a).

La enzima Amano 2A es una mezcla de enzimas proteolíticas obtenidas de *Aspergillus oryzae*, su nombre se debe a la empresa que la fabrica: Amano Int. Enzyme Co. Inc. (Manual del fabricante, 1988b).

La enzima HIT-Proteolitic 200 es obtenida de la fermentación controlada de *Bacillus subtilis*, se caracteriza por hidrolizar enlaces peptídicos internos de las proteínas y como no presenta una alta especificidad por el sustrato en particular, es capaz de producir péptidos de bajo peso molecular (Manual del fabricante, 1988c).

La enzima **Papaína** es obtenida del fruto de la *Carica papaya*, encontrándose muy concentrada en el latex. Su especificidad se limita a enlaces peptídicos que contenga los aminoácidos Arginina, Lisina, Glicina y Citrulina (*Manual del fabricante, 1988d*).

La secuencia de reacción para cada hidrolizado se muestra en la **tabla 15**, los cuales se realizaron por duplicado.

TABLA 15
PROCESOS SEGUIDOS EN LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LECHE (5%P/V)

HIDROLIZADO	ETAPA I	ETAPA II	ETAPA III
1	(HT + PA). (E S = 2 y 1%), (t = 2 hr). (T = 50°C). pH de la solución.	desactivación térmica de enzima. 10 min a ebullición. Ajuste de pH a 7.4 con NaOH 4M	(PO). (E S = 0.15%) (t = 24 hr). (pH = 7.4), (T = 50°C)
2	(AA). (E S = 1%), (t = 5 hr). (T = 50°C). pH de la solución.	igual al anterior	igual al anterior
3	(HT). (E S = 1%), (t = 5 hr). (T = 50°C). pH de la solución.	igual al anterior	igual al anterior
4		ajuste de pH a 7.4	igual al anterior
* AA = Amano 2A, HT = HT Proteolitic, PA = Papaína, PO = Pronasa.			

Con la finalidad de evitar contaminación microbiana, se tomaron medidas de prevención como son: Después de adicionar la primera enzima, se agrega benzoato de

sodio al 0.1% (P/P) como conservador, el material y el agua utilizados se esterilizan previamente en autoclave 15 minutos a 15 psig y, por último, la adición de leche, enzimas y benzoato de sodio y la toma de muestras se realiza en condiciones de asepsia.

Los matraces son tapados con tapones de gasa y cubiertos con papel aluminio, luego se colocan en incubadoras con agitación de 100 rpm y temperatura controlada.

Al terminar la reacción, se toma 1 ml del hidrolizado y se agrega una mezcla de 5 ml de "TCA" al 5% con 2 ml de agua. Se agita y después de 30 minutos se filtra en papel Watman No 5 ó 42. Al sobrenadante se le analiza su contenido de aminoácidos por HPLC.

7. Hidrólisis enzimática de caseinato de sodio: En un frasco cilíndrico de 500 ml, se agregan 250 ml de agua destilada. Se disuelven 25 g de caseinato para dar una solución al 10% (P/V). Se estabiliza la temperatura a 50 °C y se adicionan la o las enzimas y se pone en agitación a 100 rpm. Se probaron las siguientes combinaciones de enzimas:

1. Con endo y exopeptidasas: Amano 2A-Pronasa (AA-PO) y HT proteolitic-Amano 2A-Pronasa (IIT-AA-PO) (tabla 16).
2. Con endopeptidasas: IIT proteolitic (IIT), IIT proteolitic-Amano 2A (IIT-AA) y Amano 2A-Papaína (AA-PA) (tabla 17).

TABLA 16

PROCESOS DE REACCION ENZIMATICA DE CASEINATO (S = 10%)

HIDRO-LIZADO	ETAPA I	ETAPA II	ETAPA III	ETAPA IV	ETAPA V
5	(AA), (E/S = 1%), (t = 5 hr), (T = 50°C), pH de la solución.	desactivación térmica de enzima, 10 min a ebullición.	(PO), (E/S = 1%), (t = 19 hr), (T = 50°C), pH de la solución.		
6	(HT), (E/S = 2%), (t = 3 hr), (T = 50°C), pH de la solución.	desactivación térmica de enzima, 10 min a ebullición.	(AA), (E/S = 1%), (t = 4 hr), (T = 50°C), pH de la solución.	desactivación térmica de enzima, 10 min a ebullición.	(PA), (E/S = 0.01%), (t = 5 hr), (T = 50°C), pH de la solución.
7	(HT), (E/S = 2%), (t = 3 hr), (T = 50°C), pH de la solución.	desactivación térmica de enzima, 10 min a ebullición.	(AA), (E/S = 1%), (t = 4 hr), (T = 50°C), pH de la solución.	desactivación térmica de enzima, 10 min a ebullición.	(PA), (E/S = 0.01%), (t = 24 hr), (T = 60°C), pH de la solución.
* AA = Amano 2A, HT = HT Proteolitic, PA = Papaina, PO = Pronasa.					

8. Hidrólisis ácida de caseinato de sodio: Se eligió como materia prima proteica a la caseína con una concentración del 10% en HCl 6N con un tiempo máximo de 7 horas de hidrólisis. Esta se efectuó a reflujo en un equipo de destilación con dos refrigerantes de rosario y un matraz de dos bocas, una para el refrigerante, otra para la toma de muestras. El calentamiento se realizó con aceite "Brio-40" y una parrilla "Variac".

TABLA 17

PROCESOS DE REACCION ENZIMATICA DE CASEINATO (S = 10%)

HIDROLIZADO	ETAPA I	ETAPA II	ETAPA III
8	(HT), (E S = 2%). (t = 3 hr), (T = 50°C), pH de la solución.		
9	(HT), (E S = 2%). (t = 3 hr), (T = 50°C), pH de la solución.	desactivación térmica de enzima, 10 min a ebullición.	(AA), (E S = 1%), (t = hr), (T = 50°C), pH de la solución.
10	(AA + PA), (E S = 1 Y 2%), (t = 21 hr), (T = 50°C). pH de la solución.		
* AA = Amano 2A, HT = HT Proteolitic, PA = Papaína, PO = Pronasa.			

La toma de muestras se realizó cada hora para llevar un control. Estas fueron neutralizadas con igual cantidad de NaOH 6N.

9. Adsorción de fenilalanina de hidrolizados enzimáticos de leche: Para estas pruebas se utilizaron los hidrolizados 1, 2, 3 y 4 de la tabla 15. A 20 ml del hidrolizado previamente desactivado térmicamente a ebullición por 10 minutos, se agrega la cantidad de carbón activado con un 25% de exceso para retirar el 100% del contenido de fenilalanina, tirosina y triptofano, calculado como se indica más adelante (López 1989). Se pone en agitación a 100 rpm por 40 minutos a una temperatura de 25 °C.

Habiendo terminado el proceso de adsorción, se filtra o centrifuga y al sobrenadante se le analiza el contenido de aminoácidos. Si se quiere conocer el contenido de aminoácidos libres en solución, se obtiene precipitando con TCA, al sobrenadante se le analiza por HPLC, si se requiere conocer el contenido total de aminoácidos, éste se obtiene realizando una hidrólisis ácida total al sobrenadante, el cual posteriormente es analizado por HPLC.

Cálculo de carbón activado para el proceso de adsorción:

La leche descremada contiene 47.5 mg Fen/g proteína, 48.8 mg Tir/g proteína y 13.4 mg Trp/g proteína.

Si se disuelven 8.33 g de leche descremada con un contenido del 35% de proteína, en 50 ml de agua, se obtiene después de una hidrólisis de 24 horas con Amano 2A-Pronasa (AA-PO), un volumen final de 58 ml, el cual se determinó experimentalmente en una secuencias de tres determinaciones.

Para el cálculo de la cantidad de carbón activado (CA) necesario para retirar tirosina y triptofano, se supone que el carbón adsorbe estos aminoácidos en la misma forma que lo hace con la fenilalanina: 43 mg de aminoácido/g carbón activado (López 1989).

Así, para 20 ml del hidrolizado se tiene para la fenilalanina que:

$$\frac{(8,33 \text{ g leche}) (0,35 \text{ g prot.}) (47,5 \text{ mg Fen}) (1 \text{ g CA})}{(58 \text{ ml hidrol.}) (1 \text{ g leche}) (1 \text{ g prot.}) (43 \text{ mg Fen})} \times (20 \text{ ml}) = 1,11 \text{ g (CA)}$$

Realizando el cálculo de igual forma se tiene que se requieren 1.14 g para tirosina y 0.31 g para triptofano. Si se suman las cantidades de carbón activado para retirar a los tres aminoácidos del hidrolizado al 100%, se tiene que se requieren 2.56 g CA. Con un 25%, serán 3.8 g CA.

10. Adsorción de fenilalanina de hidrolizados enzimáticos de caseinato de sodio:

Para estas pruebas se utilizaron los hidrolizados 8, 9 y 10 de la **tabla 17**. A 50 ml del hidrolizado previamente desactivado térmicamente, se le agrega la cantidad de carbón necesaria para retirar 85% del contenido de fenilalanina, tirosina y triptofano en una prueba y en otra con un 5% de exceso. Se ponen en agitación a 200 rpm por 40 minutos a una temperatura de 20 °C.

Una vez terminado el proceso, se filtra la solución. Al sobrenadante se le determina su contenido de aminoácidos libres en solución (método de TCA) o de aminoácidos totales (hidrólisis ácida total) (*López, 1989*).

11. Determinación de aminoácidos por HPLC: Los aminoácidos (a excepción de triptofano, prolina, asparagina y arginina), fueron cuantificados por cromatografía en fase inversa, empleando una columna C18 con un gradiente de solventes acetonitrilo:agua, según lo descrito por *McCamun y Robins (1962)*.

A una muestra previamente neutralizada con NaOH al 20% (P/P), se le agrega el estándar interno de fluorofenilalanina. Los aminoácidos son derivatizados con

ortofaldehído y etanotiol como reductor. Los derivados se detectan por fluorometría. La cantidad de cada aminoácido se determina usando corridas patrón previamente evaluadas.

Debido al alto costo de este tipo de análisis, se realizaron frecuentemente análisis parciales de los aminoácidos: valina, metionina, isoleucina leucina y fenilalanina. Solamente se realizaba el análisis completo de aminoácidos en soluciones que se determinaba su importancia.

12. Cromatografía de filtración en gel: Se montó una columna (LKB) de 0.8 cm de diámetro interior, empacada con gel "Sephadex G-25" con un tamaño de partícula de 50-150 micras (Sigma Chemical Co.) con una altura de 57.49 cm dando un volumen de 115.57 cm³. El Sephadex es útil cuando se trata de remover solutos de bajo peso molecular de las soluciones proteicas, por su alto grado de entrecruzamiento siendo para proteínas globulares y péptidos de 1,000 a 5,000 de peso molecular (*Sephadex, 1977*).

El empaque de la columna se efectuó después de hinchar el gel durante 24 horas en el medio requerido y desgasificado durante 60 minutos con una bomba de vacío.

La separación de los péptidos se efectuó empleando un colector de fracciones (LKB 2211 Super Rac) con flujo regulado por una bomba peristáltica (Cole-Palmer) y se detectaron por espectrofotometría en un detector de flujo continuo (LKB 2138 Uvicord S), (*Manual del fabricante, 1986*). Se utilizó una longitud de onda de 280 nm que es el máximo de absorción de proteínas, péptidos y aminoácidos aromáticos. En

el caso del hidrolizado enzimático de proteínas tratado con carbón activado, en el cual se han eliminado los aminoácidos aromáticos y por lo tanto no presenta absorción a 280 nm, la detección se realizó llevando a cabo la reacción con ninhidrina, según la técnica de Moore y Stein, descrita por *Snell y Snell (1956)*, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro (Perkin-Elmer).

12.1 Selección del medio de elución

Eaker y Porath (1967), sugirieron que con un medio de piridina 1M con cloruro de sodio 0.5M a un pH 8.5, los aminoácidos aromáticos se forzarían a migrar en asociación con los iones sodio y la capacidad de adsorción del gel quedaría satisfecha por la molécula de piridina, por lo que se eligió este medio de elución.

12.2 Calibración de la columna

La calibración de la columna se efectuó inyectando muestras de diferente peso molecular como triptofano (PM 204.23), tri-tirosina (489.57) y albúmina (PM 67,000), que representan a un aminoácido, a un tripéptido y a una proteína respectivamente. Posteriormente se calcula el valor de K_{av} para cada uno y se procede a graficar el logaritmo de los pesos moleculares en las abscisas con los valores de K_{av} en las ordenadas para obtener la ecuación de la recta que permitirá evaluar los pesos moleculares de los hidrolizados ácidos y los hidrolizados enzimáticos (*Fischer, 1975*).

12.3 Evaluación de los hidrolizados

Los siete hidrolizados ácidos de caseína obtenidos fueron evaluados bajo las mismas condiciones de la calibración de la columna. Posteriormente mediante el cromatograma obtenido se determina el volumen de elución para poder ser evaluados cualitativa y cuantitativamente.

Para corroborar lo anterior, se usó la cromatografía en capa delgada.

13. Cromatografía en capa delgada: Se realizó en placas de sílica gel (Merck). La aplicación de la muestra se realizó con una microjeringa Hamilton y después de varias pruebas, se eligió colocar 50 microlitros de muestra en tres dosis, esperando que se secara cada una a fin de que la mancha no fuera mayor de 0.5 cm de diámetro (Nuño, 1977).

13.1 Selección del solvente de la muestra

Se probaron dos sistemas de solventes:

- 1) cloroformo-acetona (9:1) y
- 2) etanol-agua (63:37).

La visualización se llevó a cabo con ninhidrina en aerosol, (Merck).

13.2 Calibración de la placa

La calibración de la placa se efectuó con muestras de diferente peso molecular:

-albúmina (PM 67.000)	-glicilfenilalanina (PM 222.26)
-gramicidina (PM 1.141.49)	-triptofano (PM 204.23)
-tri-tirosina (PM 507.57)	-fenilalanina (PM 165.19)
-alanilmecionina (PM 220.30)	-alanina (PM 89.09)

13.3 Evaluación de los hidrolizados

Las muestras que presentaron un máximo de absorción en la cromatografía en columna fueron analizadas por cromatografía en capa delgada bajo las mismas condiciones que los estándares que caracterizaron a la placa.

Los resultados fueron comparados con los resultados obtenidos con la cromatografía en columna a fin de poder concluir.

6 RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION

A manera de ejemplo, en las figuras 15 y 16 se puede observar un típico análisis parcial de aminoácidos y un análisis total de aminoácidos respectivamente.

6.2 HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE LECHE

El objetivo que se persiguió fue la selección de un sistema enzimático que permitiese la máxima liberación de fenilalanina de la proteína de leche descremada. En la tabla 18 se da un resumen de las combinaciones de enzimas que se llevaron a la selección del proceso, en la cual se puede observar que la hidrólisis enzimática de leche descremada al 5% llevada a cabo por Amano 2A (AA) a 50 °C con una relación E/S de 1%, seguida por una hidrólisis con Pronasa (PO) a 40 °C y una E/S de 0.75%, resulta en la más alta liberación de fenilalanina de la proteína (aproximadamente el 50% de los 53.2 mg de fenilalanina/g de proteína originales).

Sin embargo, al hacer una evaluación económica del proceso de reacción bajo las condiciones propuestas, el costo de las enzimas resulta excesivo, debido a que el costo de la enzima Pronasa (PO) es muy alto, aproximadamente de 20,000 dólares/Kg en 1989. Con este costo, para procesar un kilogramo de proteína aproximadamente 2.8 kilogramos de leche en polvo descremada con 35% de proteína, se requieren de 7.5 gramos de enzima con un costo de 150 dólares aproximadamente. Si el costo de la leche en polvo se toma como 2 dólares/Kg, se observa que la enzima cuesta 25 veces más que el sustrato, con lo cual el proceso no es factible desde el punto de vista

económico.

Por tal motivo, se decidió llevar a cabo una optimización en la cantidad de Pronasa (PO) utilizada en el proceso, con la finalidad de buscar una reducción notable en la cantidad y el costo de dicha enzima.

La primera etapa de este proceso fue la caracterización de la enzima Pronasa (PO). En un análisis de las condiciones de reacción de las hidrólisis de la **tabla 18** se determinó que las hidrólisis con Amano 2A-Pronasa (AA-PO) se llevaron a cabo al pH que imponía la mezcla de reacción, es decir, al inicio de la reacción el de la solución de leche era aproximadamente 6.8 y al final de la reacción con Amano 2A (AA) el pH era de aproximadamente 6.0 manteniéndose más o menos constante durante la hidrólisis con Pronasa (PO).

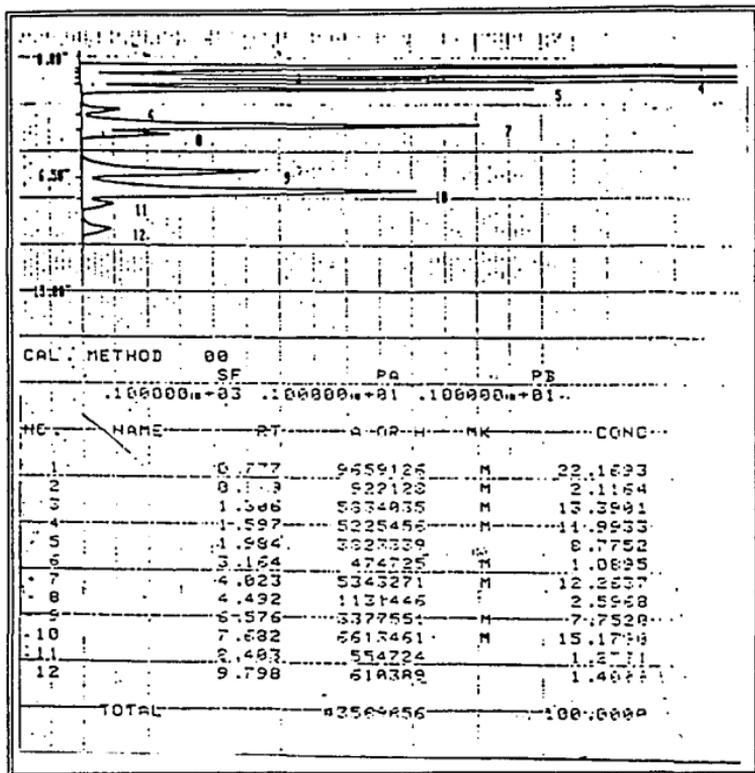


FIGURA 15

Resultado típico de un análisis parcial de aminoácidos por HPLC. La numeración corresponde a Val (7), Met (8), Leu (9), Ile (10), Fen (11), Estándar interno (12). El ejemplo corresponde al hidrolizado enzimático de caseína (S=10%), con (AA-PA) (E/S=1 y 2%, t=21 hr, T=50°C), después del tratamiento con carbón activado a una dosis de 85% del requerimiento para eliminar Fen, Tir y Trp. El análisis se realizó al hidrolizado ácido resultante del proceso.

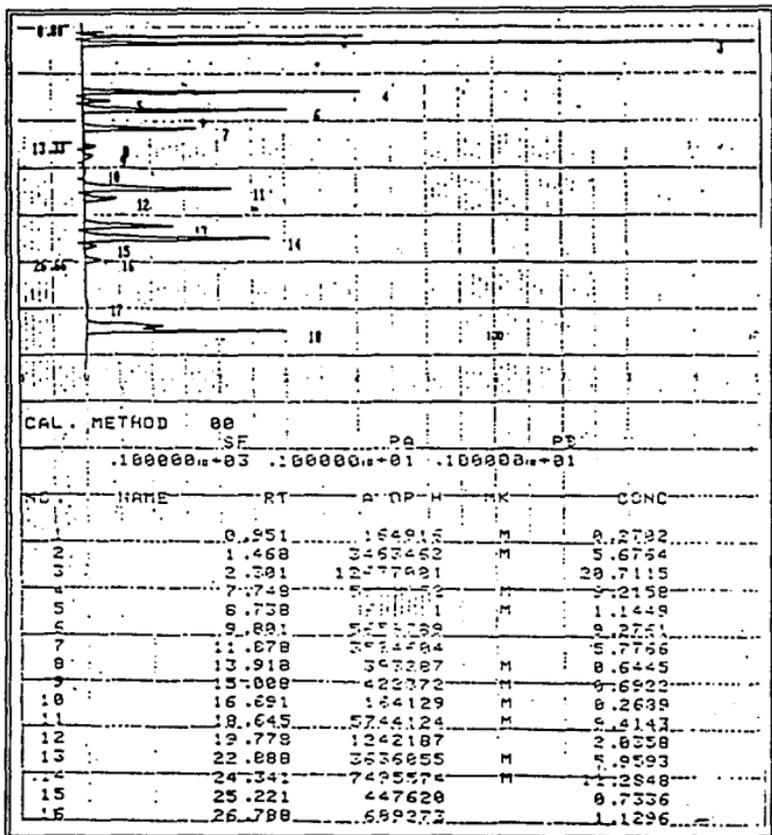


FIGURA 16

Resultado típico de un análisis total de aminoácidos por HPLC. La figura muestra el análisis para el hidrolizado descrito en la figura 15, tratado con un 5% de exceso del carbón activado necesario para retirar el 100% de Fen, Tir y Trp.

TABLA 18
RESULTADO DE HIDROLISIS ENZIMATICA DE LECHE DESCREMADA
(Lara, 1988)

PROTEA-SA	[S]	[E/S]	T (°C)	t (hr)	mg Fen liberados/g proteína inicial
AA	1	1	50	5	12.7
AA	3	1	50	5	12.3
AA	5	1	50	5	7.2
AA	10	1	50	5	12.0
AA-HT	10	1-2	50	4	11.0
AA-PA	10	1-2	50	4	8.4
AA-PO	10	1-1.5	50-40	5/5	15.0
AA-PO	10	1-1.5	50-40	5/24	26.0
AA-PO	5	1-1.5	50-40	5/5	22.0
AA-PO	5	1-1.5	50-40	5/24	24.0
AA-PO	3	1-1.5	50-40	5/5	22.0
AA-PO	1	1-1.5	50-40	5/5	23.0
AA-PO	5	1-0.75	50-40	5/24	27.6
AA-PO	5	1-0.5	50-40	5/24	26.7
AA-PO	5	1-0.25	50-40	5/24	22.5
AA-PO	5	1-0.1	50-40	5/24	19.0
AA-PO	5	1-0.1	50-45	5/24	14.3
AA-PO	5	1-0.1	50-50	5/24	16.5
AA-PO	5	1-0.1	50-55	5/24	18.5

• [S]= concentración de proteína en la mezcla de reacción (P/V)
[E/S]= relación enzima-sustrato (%P)

•• AA= Amano 2A, HT= IIT Protcolitic, PA= Papaína, PO= Pronasa.

La máxima actividad de la enzima se sitúa alrededor de los 60 °C, lo que significa que la reacción definida puede realizarse a una mayor temperatura. Por otro lado, se sabe que esta temperatura evita la contaminación microbiana, por lo que es aceptable para el proyecto.

De acuerdo a *Hill, (1965)*, la reacción con proteasas seguida de una reacción con Pronasa (PO), no cambia mucho el resultado final en cuanto al grado de hidrólisis

obtenido, con respecto a la reacción únicamente con Pronasa. Con lo anterior se puede concluir que el proceso definido puede aún mejorarse, específicamente en lo que respecta a temperatura, pH y relación E/S.

Para lo cual, se plantearon una serie de hidrólisis en las cuales se plantearon las siguientes estrategias:

1. Disminuir la cantidad de Pronasa de una relación E/S de 0.75 a 0.15
2. Aumentar la temperatura de reacción en 5 °C, para compensar la disminución de la concentración de enzima, para evaluar si el rendimiento de liberación de fenilalanina se mantenía.
3. Controlar el pH de la reacción con Pronasa (PO) a 7.4
4. Efectuar experimentos con otras enzimas proteolíticas diferentes a Amano 2A (AA), en particular con Papaína (PA), y HT Proteolitic (HT).
5. Agregar un agente conservador para evitar la contaminación microbiana: el benzoato de sodio al 0.1%

La **tabla 19** muestra los promedios de los resultados de duplicados de cada hidrolizado en la cual se puede observar que el rendimiento se mantiene en el mismo rango a pesar de haber disminuido la dosis de la enzima Pronasa (PO). El uso de la enzima HT Proteolitic (HT) en lugar de Amano 2A (AA), libera una cantidad similar de fenilalanina bajo las mismas condiciones, lo que puede beneficiar en disminuir el costo del proyecto ya que la enzima (HT) tiene un costo de 10 dólares/Kg (1989) y la (AA) de 100 dólares/Kg (1989), si la combinación de (HT-PO) hubiese sido elegida.

TABLA 19
LIBERACION DE FENILALANINA EN HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE
LECHE DESCREMADA
(T= 45 °C)

PROTEASA	[S]	[E/S]	t(hr) de reacción	mg Fen/g proteína
PO	5	0.15	24	18.9
AA-PO	5	1-0.15	5/24	27.1
HT-PO	5	1-0.15	5/24	26.3
HT-PA+PO	5	1-2.0.15	2/24	19.1

* [S]= concentración de proteína en la mezcla de reacción (P/V)
[E:S]= relación enzima-sustrato (% P)

** AA= Amano 2A, HT= HT Proteolitic, PA= Papaína, PO= Pronasa.

La contaminación microbiana logró evitarse con la utilización de benzoato de sodio al 0.1% y con el aumento de temperatura en 5 °C. Sin embargo, durante el tratamiento de adsorción y aún cuando permanecían en congelación por un día, previo a la adsorción, algunas muestras presentaban contaminación microbiana.

A pesar de que se logró disminuir la cantidad de enzima, el costo aún era excesivo para el proceso. Así, se planteó cambiar el sustrato de tal modo que esto se minimizara, al igual que la contaminación microbiana.

6.3 HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE CASEINATO DE SODIO

El cambio propuesto fue el usar caseinato de sodio en lugar de leche descremada, con lo cual se elimina el material fermentable por los microorganismos.

Se eligió este sustrato gracias a su composición de aminoácidos muy semejante con la leche descremada, cuya proteína está formada por un 80% de caseína, la cual es atacada de manera específica por las enzimas que se han estado utilizando, con lo que habría pocos cambios en la especificidad de hidrólisis.

Otro aspecto de importancia en la elección del caseinato de sodio, fue su relativa alta solubilidad en agua.

En la **tabla 20** se presentan los resultados de hidrólisis con caseinato, en los cuales disminuyó la cantidad de Pronasa, se aumentó la temperatura, y se usó HT Proteolitic (HT) seguida de la hidrólisis de Amano 2A con Pronasa (AA-PO), a diferentes tiempos de reacción.

Se aprecia que la liberación de fenilalanina, se mantenía en un mismo orden de magnitud que cuando se usaba $[E/S] = 0.15$ en leche descremada, si se aumentaba la temperatura en 10 °C y $[E/S]$ para Pronasa (PO) se disminuía a 0.01%

Sin embargo cuando se le aumentaba una etapa con una endopeptidasa (HT), la liberación de fenilalanina disminuía notoriamente si la temperatura se disminuía en 5 °C, aún prolongando el tiempo de hidrólisis con (PO), de 19 a 24 horas.

Por lo anterior y considerando que la disponibilidad de exopeptidasas es baja y que aún a dosis extremadamente pequeñas, el costo de Pronasa repercutía considerablemente en el costo de producción del alimento, se decidió analizar el efecto de la separación por adsorción en hidrolizados obtenidos con endopeptidasas

únicamente, estudiando específicamente el uso de la Papaina (PA).

Ya se preveía una pérdida en los aminoácidos ligados a aquellos que son adsorbidos fuertemente por el carbón activado, debido a que el uso de enzimas endopeptídicas disminuye la liberación de tales aminoácidos durante la reacción. Por lo que se tuvo que comparar el costo de la adición de los aminoácidos que se perdieran durante el proceso de adsorción con el costo del uso de la enzima exopeptídica, (PO) (Tabla 20).

TABLA 20
LIBERACION DE FENILALANINA EN HIDROLIZADOS DE CASEINATO DE SODIO.

PROTEASA	[S]	[E/S]	T (°C)	t (hr)	mg Fen liberados/g proteína inicial
AA-PO	10	2-0.05	50-60	5/19	21.40
IIT-AA-PO	10	2-1-0.01	50-50:45	3/4/5	15.00
IIT-AA-PO	10	2-1-0.01	50-50:45	3/4/24	17.60
HT	10	2	50	3	< 1
IIT-AA	10	2-1	50-50	3/4	13.50
AA+PA	10	1-2	50	21	16.50

• [S]= concentración de proteína en la mezcla de reacción (P/V)
[E:S]= relación enzima-sustrato (%P)

•• AA= Amano 2A, IIT= IIT Proteolitic, PA= Papaina, PO= Pronasa.

Después de evaluar el trabajo realizado hasta esta etapa, se concluyó, usar el sistema enzimático (AA-PA) en forma simultánea con una [E/S] de 1 y 2 respectivamente, sobre caseinato de sodio como sustrato a una concentración del 10% y a una temperatura de 50 °C por un lapso de 20 horas. Las razones para ello son:

-
1. Es el sistema de enzimas endopeptídicas que obtiene la máxima liberación de fenilalanina, de todas las combinaciones probadas.
 2. Las enzimas se encuentran disponibles en México.
 3. El costo de estas enzimas es más bajo que el de las demás enzimas probadas (100 y 50 dólares/Kg respectivamente en 1989).
 4. La contaminación microbiana se elimina totalmente con caseinato de sodio como sustrato.
 5. Las enzimas Amano 2A y Papaína están autorizadas por la FDA, para ser utilizadas en alimentos.

6.4 HIDROLIZADOS ACIDOS DE CASEINATO DE SODIO.

Posterior a la elección de un nuevo sustrato para la hidrólisis enzimática, se inició la fase de hidrólisis ácida, los hidrolizados fueron caracterizados cromatográficamente a fin de compararlos con la caracterización del hidrolizado enzimático elegido como el óptimo y definir el peso molecular de las fracciones que los conforman.

6.5 ELIMINACION DE FENILALANINA DE HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE PROTEINA

Se realizaron pruebas de eliminación de fenilalanina por adsorción física con carbón activado mineral (DGR8X30) y vegetal (VG10X35) sobre hidrolizados de proteína de diversos grados de liberación de fenilalanina, bajo las condiciones de adsorción determinadas experimentalmente por *López, (1989)*. (**tabla 21**).

TABLA 21
CONDICIONES DE USO DEL CARBÓN ACTIVADO DGR8X30 PARA LA
ADSORCIÓN DE FENILALANINA (López, (1989).

PARAMETRO	CONDICIONES
fabricante	Clarificantes Mexicanos, S.A. de C.V.
forma física	granular
origen	mineral
pH de uso	impuesto por el material
temperatura de operación	20° C
tiempo de contacto batch	30 minutos a 250 rpm
[fenilalanina:carbón]	0.043 g Fen/g carbón activado
aminoácidos retenidos fuertemente (> 50 %)	Trp. Fen, Tir. His, Met y Cis
selectividad aparente	Trp > Fen = Tir > Met = His = Cis > Gli = Ala = Val = Ile = Leu = Pro > Arg = Lis = Asn = Gln > Asp = Glu = Ser = Tre.

Se realizaron pruebas de eliminación de fenilalanina por adsorción física con carbón activado sobre hidrolizados de proteína con diversos grados de liberación de fenilalanina, bajo las condiciones de adsorción determinadas experimentalmente.

En la **tabla 22** se resumen los resultados de adsorción de fenilalanina con carbón activado para diversos hidrolizados de leche descremada. Se puede observar que el carbón mineral y vegetal tienen la misma afinidad por la fenilalanina en los hidrolizados probados.

En la **tabla 23** se muestran los resultados del análisis parcial de aminoácidos en la cual se verifica que con el hidrolizado (AA-PO), se obtuvo la mayor cantidad de

TABLA 22
RETENCION DE FENILALANINA POR ADSORCION EN DIVERSOS HIDROLI-
ZADOS DE LECHE

HIDROLIZADO	ADSORBENTE	(%) DE LA DOSIS PARA ELIMINAR Fen, Tir y Trp	Fen LIBRE DESPUES DE LA ADSORCION	(%) DE Fen ELIMINADO
(PO)	C.A. DGR (8x30)	100	---	90
(AA - PO)	C.A. DGR (8x30)	125	3.34	90
		125	3.41	80
(HT - PO)	C.A. DGR (8x30)	125	2.65	93
(HT + PA/PO)	C.A. DGR (8x30)	125	2.40	93
		C.A. VG (10x35)	2.50	93
* Las condiciones de preparación de estos hidrolizados son las presentadas en la tabla 19.				
** AA = Amano 2A, HT = HT Proteolitic, PA = Papaína, PO = Pronasa.				

aminoácidos libres en solución después del tratamiento con carbón activado mineral y vegetal, debido posiblemente a que esta mezcla de enzimas es la que produce el grado de hidrólisis más extenso.

La **tabla 24** muestra los resultados del análisis total de aminoácidos en los hidrolizados después del proceso de adsorción. Se presentan los resultados del análisis total de aminoácidos por HPLC, de los diversos hidrolizados ensayados después del tratamiento con carbón activado. Se puede observar que con el hidrolizado de (AA-PO) tratado con carbón activado tanto mineral como vegetal, se obtiene la menor retención de aminoácidos, con respecto a los otros hidrolizados.

TABLA 23
ADSORCION DE ALGUNOS AMINOACIDOS A PARTIR DE DIVERSOS
HIDROLIZADOS DE LECHE DESCREMADA CON CARBON ACTIVADO

HIDROLIZADO	AMINOACIDO	(mg del a.a./g de proteína) en solución después del tratamiento	
		C.A. DGR (8x30)	C.A. VG (10x35)
HT-PA-PO	Val	11.2	11.8
	Met	6.9	7.7
	Ile	9.0	9.5
	Leu	44.3	48.2
AA-PO	Val	21.6	18.4
	Met	8.9	8.7
	Ile	17.7	15.4
	Leu	62.9	57.2
HT-PO	Val	13.2	----
	Met	7.2	----
	Ile	9.4	----
	Leu	51.2	----

* AA = Amano 2A, HT = HT Proteolitic, PA = Papafna, PO = Pronasa.

Se puede decir que la falta de especificidad en la adsorción de aminoácidos por parte del carbon activado, influyó en la pérdida de los mismos fuera desde un 30% para el aspartato, hasta un 90% para fenilalanina. Globalmente la pérdida de aminoácidos alcanzó un nivel del 50% lo que provoca que el proceso sea medianamente eficiente en cuanto a productividad, sin embargo, el proceso resulta económicamente factible (López 1989).

Se observó que al utilizar leche descremada como sustrato, en la etapa de agregar el carbón activado, se forma una solución viscosa probablemente debido a la alta

TABLA 24

RESULTADO DEL ANALISIS DE HIDROLIZADOS DE LECHE DESCREMADA
DESPUES DEL PROCESO DE ADSORCION

AMINO- ACIDO	(mg de aminoácido/g de proteína)					RETENCION
	HT-PA-PO-M	PO-M	HT-PO-M	AA-PO-V	AA-PO-M	*
Asp	31.6	----	27.9	36.6	35.3	33
Glu	75.9	----	83.3	108.1	89.5	48
Ser	24.1	----	20.2	25.5	24.4	46
His	5.5	----	4.0	8.1	9.6	47
Ala	12.2	----	12.8	15.3	15.5	35
Arg	3.2	----	3.1	3.7	4.6	89
Tir	9.2	----	10.6	11.1	14.0	68
Val	22.0	30.1	21.6	31.5	33.7	44
Met	9.5	10.3	8.9	12.4	30.7	60
Ile	19.3	24.4	19.4	28.0	28.8	49
Leu	46.9	59.4	48.6	62.9	65.5	32
Fen	3.7	4.1	3.5	4.5	4.5	90

* % de retención del aminoácido en carbón activado mineral (DGR 8x30) en el hidrolizado de (AA-PO).

** AA = Amino 2A, HT = HT Proteolitic, PA = Papaína, PO = Pronasa.

*** M = Carbón activado mineral (DGR 8x30), V = Carbón activado vegetal (VG 10x35).

concentración de lactosa, lo que requiere que la separación del carbón activado se realice por centrifugación con una velocidad mayor de 10,000 rpm en lugar del método de filtración.

La tabla 25 presenta los resultados de la adsorción con carbón activado sobre un hidrolizado de caseína obtenido con las enzimas (AA-PO), bajo las condiciones definitivas de hidrólisis. Se puede observar que el cambio en el sustrato de la reacción de

hidrólisis, no afecta el nivel de retención de fenilalanina, sin embargo, aumenta la retención de los aminoácidos restantes hasta un nivel global del 55% (determinado como proteína total final).

Debido a que la dosis del 5% de exceso de carbón activado, logra eliminar la fenilalanina en el nivel requerido, se definió que la dosis de trabajo fuera de 2.95 gramos de carbón activado por gramo de proteína inicial.

TABLA 25
ADSORCION DE AMINOACIDOS POR CARBON ACTIVADO DGR8X830
SOBRE HIDROLIZADO DE CASEINA CON AMANO 2A-PAPAINA.

AMINOACIDO	mg a.a./g proteína		% de pérdida del aminoácido en dosis
	105% (*)	85% (**)	105%
Asp	34	n.d.	52
Glu	109	n.d.	50
Ser	35	n.d.	42
His	9	n.d.	69
Gli-Tre	58	n.d.	13
Ala	19	n.d.	38
Arg	4	n.d.	89
Tir	6	n.d.	90
Val	35	37	48
Met	10	10	64
Ile	27	28	50
Leu	56	56	41
Fen	4	6	92
Lis	65	n.d.	10

(*) 5% de exceso de la dosis de carbón activado necesario para retirar el 100% de Fen, Tir y Trp.

(**) 85% de la dosis de carbón activado necesario para retirar el 100% de Fen, Tir y Trp.

6.6 CROMATOGRAFIA DE FILTRACION EN GEL

Las figuras 17 y 18 nos muestran el patrón de elución de los estándares utilizados para la caracterización de la columna cromatográfica. Los datos que caracterizan a la columna son los siguientes:

TABLA 26
CARACTERIZACION DE LA COLUMNA CROMATOGRAFICA

volumen total del medio	$V_t = 115.57 \text{ cm}^3$
volumen muerto	$V_o = 52.00 \text{ cm}^3$
volumen del gel	$V_x = 55.47 \text{ cm}^3$
volumen interno	$V_i = 41.61 \text{ cm}^3$
peso de la matriz del gel	$M_g = 23.11 \text{ g}$
volumen específico	$V_g = 0.60 \text{ cm}^3/\text{g}$
agua recuperada	$A_r = 2.50 \text{ cm}^3/\text{g gel seco}$
volumen medio del gel	$V_m = 5.00 \text{ cm}^3/\text{g gel seco}$

La velocidad del flujo a través del medio cromatográfico no se incluye en la tabla debido a que fue fluctuante por fallas de la bomba peristáltica, la cual dió un flujo promedio de:

$$F = 0.357 \text{ ml/min} = 21.42 \text{ ml/hr}$$

El peso molecular tampoco se puede determinar graficando el logaritmo de los pesos moleculares en las abscisas con los valores de (K_{av}) en las ordenadas, ya que los valores obtenidos para los estándares, denotan que se presentó adsorción:

$$K_{av}(\text{triptofano}) = 1.60 \quad K_{av}(\text{tri-tirosina}) = 1.51$$

Por lo anterior sólo se podrán comparar las muestra problemas de manera cualitativa infiriendo que:

- a) Aquellas sustancias con volúmenes de elución cercanos al volumen de elución de la albúmina, serán proteínas.
- b) Aquellas sustancias con volúmenes de elución cercanos, pero menores al volumen de elución de la tri-tirosina, serán péptidos con más de tres aminoácidos en su estructura molecular.
- c) Aquellas sustancias con volúmenes de elución mayores del volumen de elución de la tri-tirosina, serán fracciones que contengan en su estructura molecular menos de tres aminoácidos.

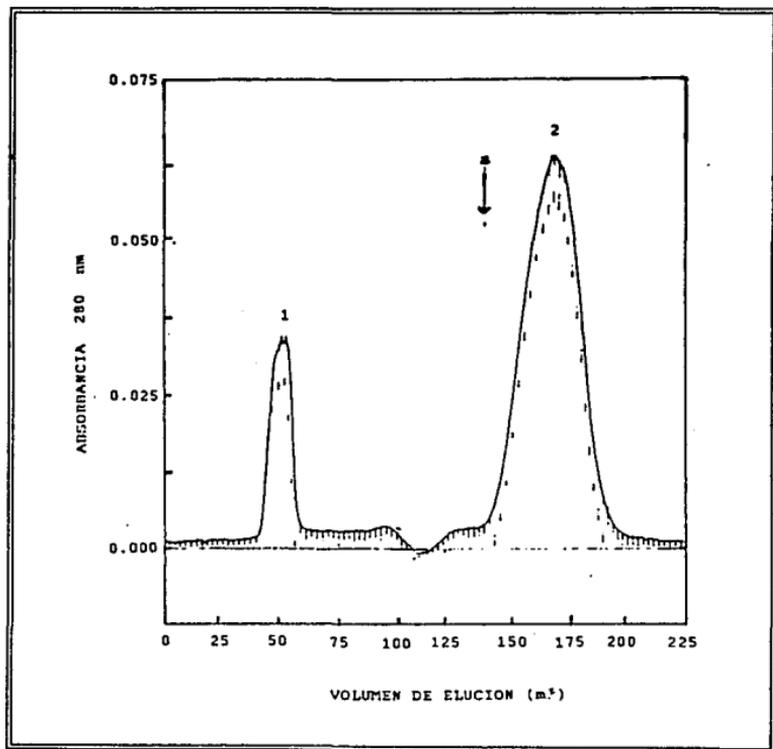


FIGURA 17

Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:

1) Albúmina sérica bovina (PM 67,000)

2) Triptofano (PM 204.23)

Se indica con la flecha el volumen de elución que se muestra en la figura 18:

• Tirosil-tirosil-tirosina (PM 507.57)

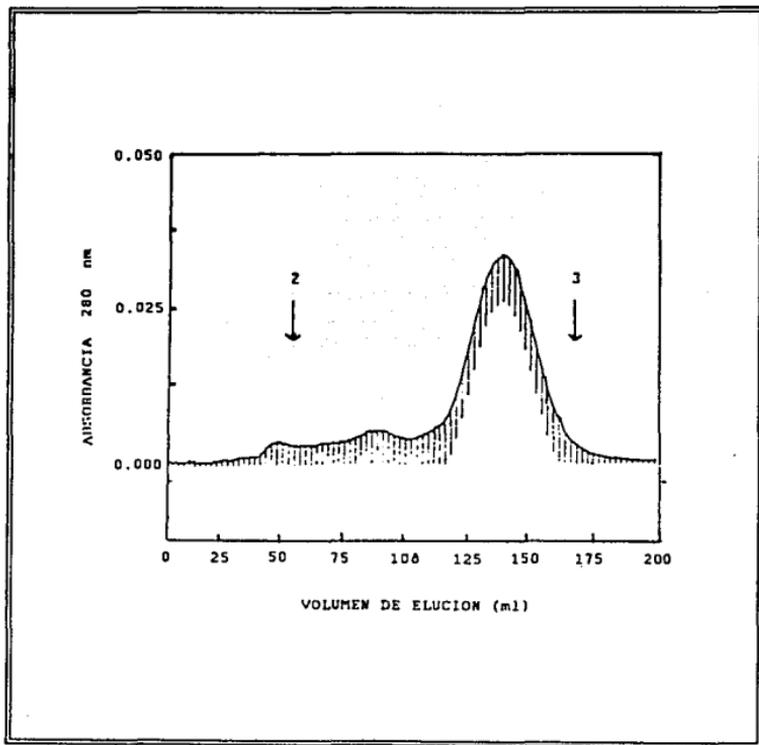


FIGURA 18

Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:

1) Tiroxil-tiroxil-tirosina (PM 507.57)

Se indica con la flecha el volumen de elución que se muestra en la figura 17:

• Albúmina sérica bovina (PM 67.000)

•• Triptofano (PM 204.23)

6.6.1 Evaluación de los hidrolizados:

Para facilitar la explicación de los resultados obtenidos se optó por identificar a los picos de cada cromatograma mediante una clave, la cual está formada por lo siguiente:

- a) Dos letras mayúsculas que pueden ser **HA** ó **HE** que identifican a los hidrolizados ácidos o a los hidrolizados enzimáticos.
- b) Las letras están separadas por un guión de un número que se refiere al tiempo en horas de hidrólisis efectuada. Estos pueden ser del **1** al **7** para los hidrolizados ácidos o el **20** para el hidrolizado enzimático.
- c) Los números están separados por un guión de otro número que se refiere al número de pico, por orden de elución. Son del **1** al **3**.

En la **figura 19** se muestra el perfil de elución a la primera hora de hidrólisis ácida de la caseína. Se observa un pico (**HA-1-1**) con un volumen de elución cercano al volumen de elución de la albúmina, lo que lo coloca en la posición de los oligopéptidos de alto peso molecular. Aparecen otros dos picos (**HA-1-2**) y (**HA-1-3**), con volúmenes de elución de aproximadamente 52 y 136 ml respectivamente, es decir, que son péptidos con más de tres aminoácidos.

En la **figura 20** se presenta un cromatograma a la segunda hora de hidrólisis ácida de la caseína donde el pico de los oligopéptidos de alto peso molecular (**HA-2-1**) disminuye notoriamente y los otros dos picos (**HA-2-2**) y (**HA-2-3**) permanecen con el mismo rango de volumen de elución.

A partir de la tercera hora de hidrólisis de la caseína, (**figuras 21, 22, 23, 24 y 25**), se observa que el pico de los oligopéptidos de alto peso molecular desaparece [**HA-3-1, HA-4-1, HA-5-1, HA-6-1 y HA-7-1**] y sólo los picos de péptidos con más de tres aminoácidos continúan. [(**HA-3-2**), (**HA-3-3**), (**HA-4-2**), (**HA-4-3**), (**HA-5-2**), (**HA-5-3**), (**HA-6-2**), (**HA-6-3**), (**HA-7-2**) e (**HA-7-3**) respectivamente].

Para el hidrolizado enzimático de caseína con 20 horas de hidrólisis (**figura 26**) se observan tres picos. El primero (**HE-20-1**) se encuentra en la posición de los oligopéptidos de alto peso molecular, el segundo (**HE-20-2**) se encuentra en la posición de los péptidos de tres o menos aminoácidos y el tercero (**HE-20-3**) está francamente en la posición de los aminoácidos.

En el hidrolizado enzimático de caseína tratado con carbón activado (**figura 27**) como era de esperarse, no se detecta ningún pico en la evaluación espectrofotométrica a 280 nm, debido a la eliminación de los aminoácidos aromáticos, sin embargo al realizar la reacción con ninhidrina se detectó un pico, que representa a los péptidos de más de tres aminoácidos. Para corroborar lo anterior, se usó la cromatografía en capa delgada.

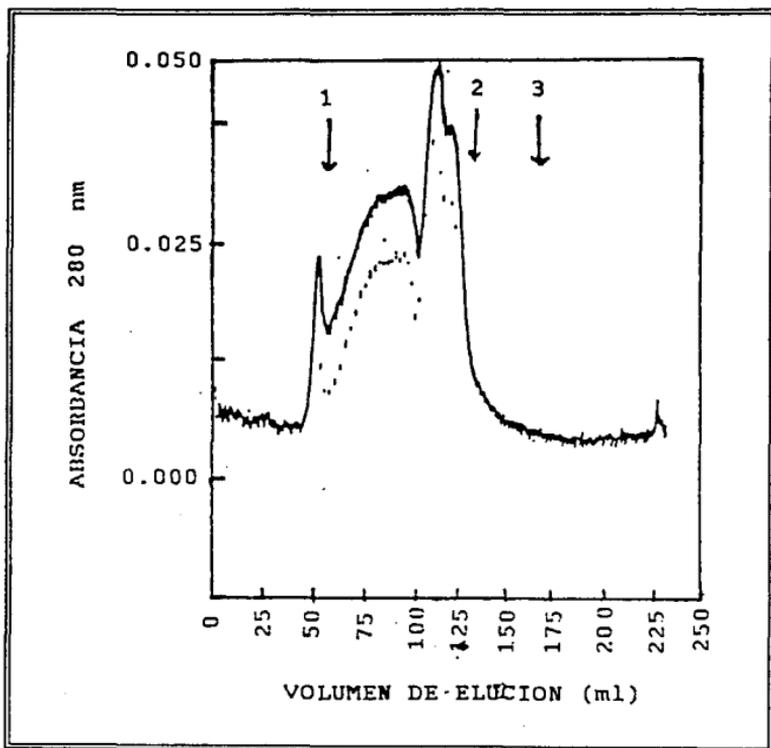


FIGURA 19

Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:
 Hidrolizado ácido con 1 hora de hidrólisis, 10g caseína/100 ml, HCl 6N

Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:

1) Albúmina sérica bovina (PM 67.000)

2) Tirosil-tirosil-tirosina (PM 507.57)

3) Triptofano (PM 204.23)

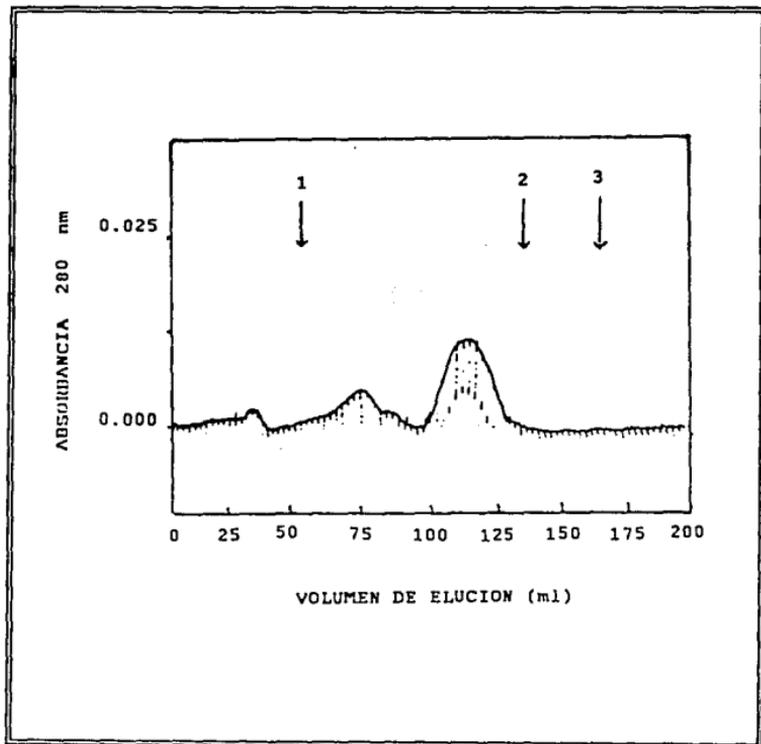


FIGURA 20

Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:
 Hidrolizado ácido con 2 horas de hidrólisis, 10g caseína/100 ml, HCl 6N

Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:

- 1) Albúmina sérica bovina (PM 67.000)
- 2) Tiroxil-tiroxil-tirosina (PM 507.57)
- 3) Triptofano (PM 204.23)

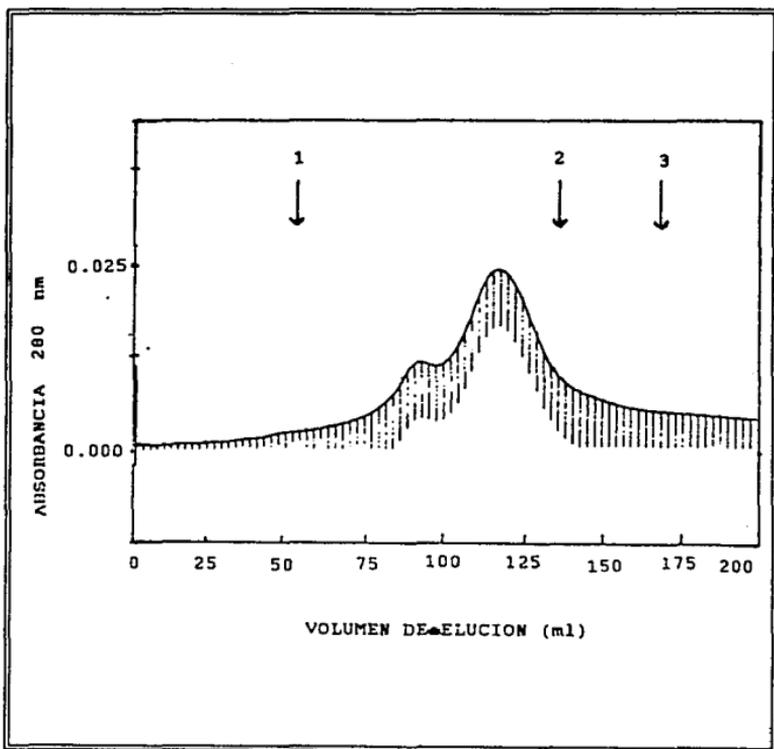


FIGURA 21

**Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:
Hidrolizado ácido con 3 horas de hidrólisis, 10g caseína/100 ml, HCl 6N**
Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:

- 1) Albúmina sérica bovina (PM 67,000)
- 2) Tiroxil-tiroxil-tirosina (PM 507.57)
- 3) Triptofano (PM 204.23)

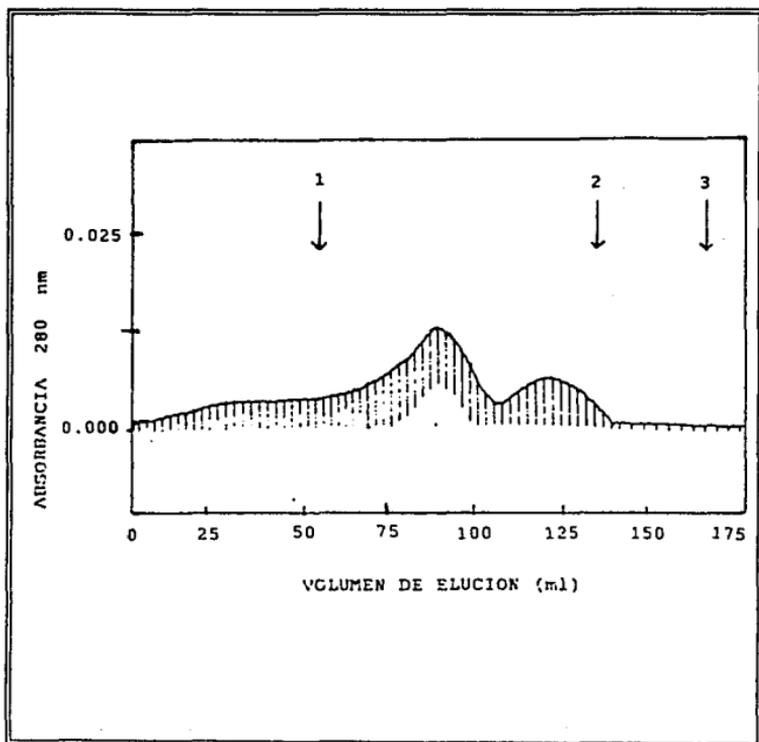


FIGURA 22

**Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:
 Hidrolizado ácido con 4 horas de hidrólisis, 10g caseína/100 ml, HCl 6N**
 Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:
 1) Albúmina sérica bovina (PM 67.000)
 2) Tirosil-tirosil-tirosina (PM 507.57)
 3) Triptofano (PM 204.23)

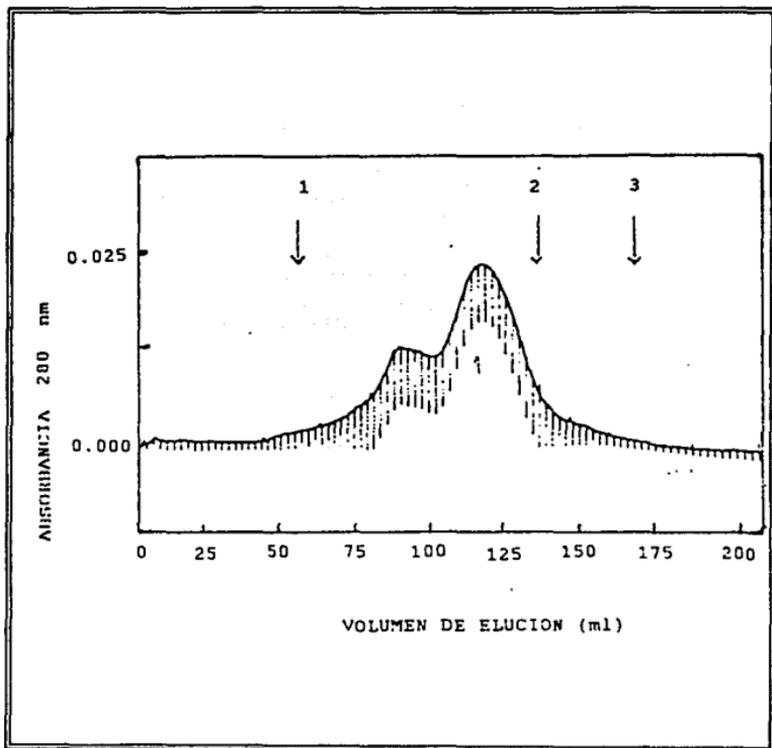


FIGURA 23

**Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:
Hidrolizado ácido con 5 horas de hidrólisis, 10g caseína/100 ml, HCl 6N**
Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:

- 1) Albúmina sérica bovina (PM 67,000)
- 2) Tirosil-tirosil-tirosina (PM 507.57)
- 3) Triptofano (PM 204.23)

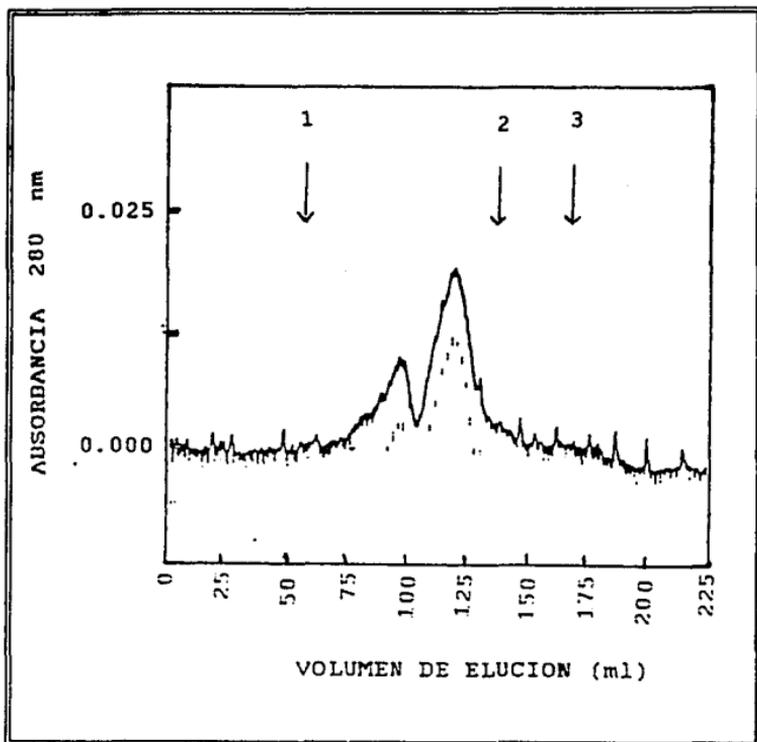


FIGURA 24

**Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8,5 de:
Hidrolizado ácido con 6 horas de hidrólisis, 10g caseína/100 ml, HCl 6N**
Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:

- 1) Albúmina sérica bovina (PM 67.000)
- 2) Tiroxil-tiroxil-tirosina (PM 507.57)
- 3) Triptofano (PM 204.23)

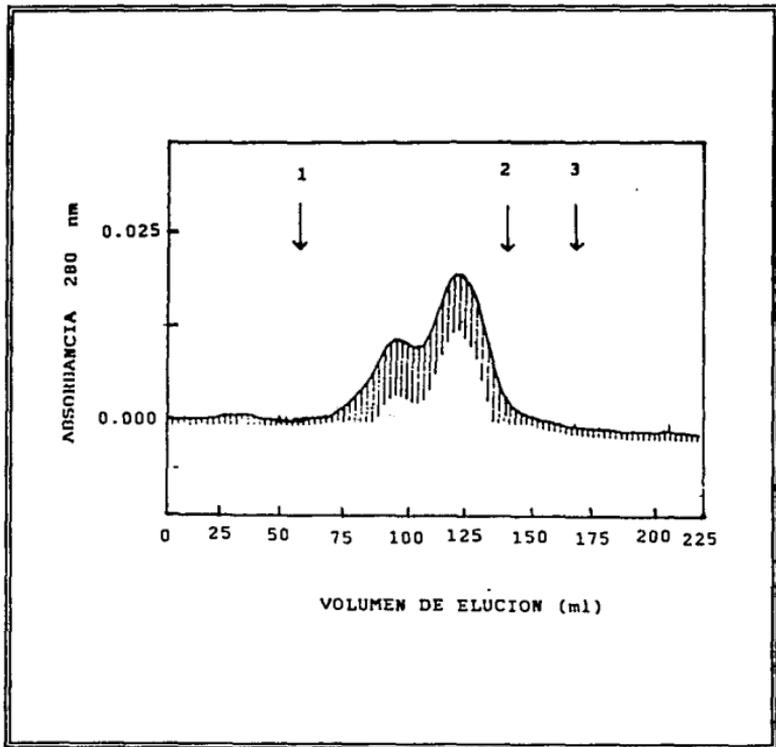


FIGURA 25

Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:
 Hidrolizado ácido con 7 horas de hidrólisis, 10g caseína/100 ml, HCl 6N
 Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:

- 1) Albúmina sérica bovina (PM 67,000)
- 2) Tiroxil-tiroxil-tirosina (PM 507.57)
- 3) Triptofano (PM 204.23)

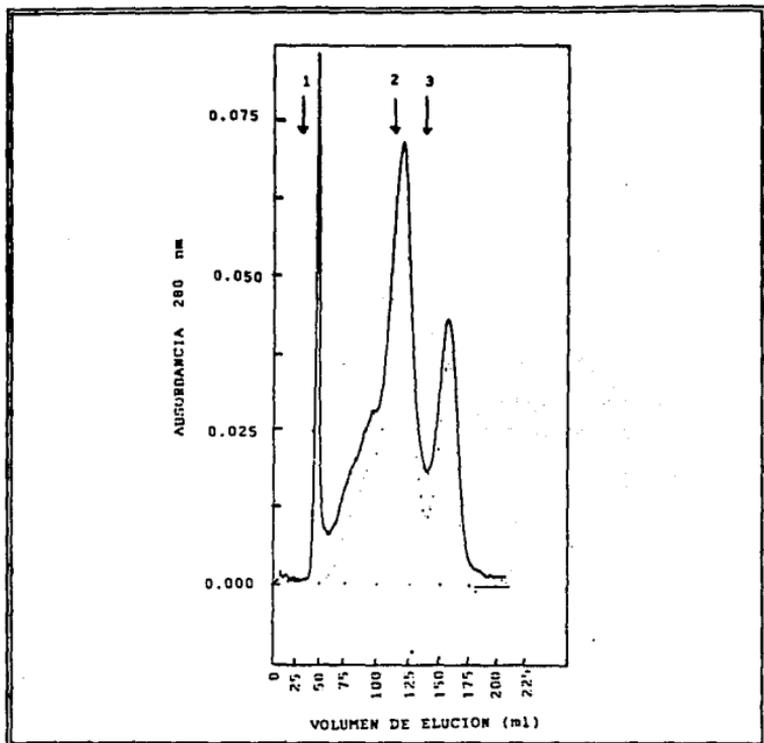


FIGURA 26

**Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:
Hidrolizado enzimático con 20 horas de hidrólisis: [1g (AA) + 2g (PA)] / 100g caseína.**
Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:

- 1) Albúmina sérica bovina (PM 67.000)
- 2) Tirosil-tirosil-tirosina (PM 507.57)
- 3) Triptofano (PM 204.23)

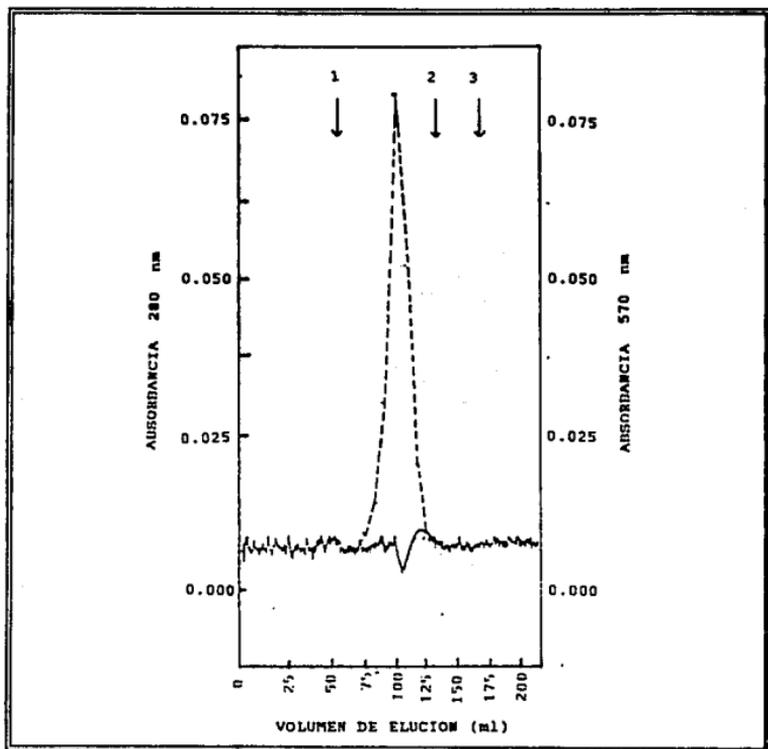


FIGURA 27

Patrón de Elución con Piridina 1M, NaCl 0.5M y pH 8.5 de:
 Hidrolizado enzimático con 20 horas de hidrólisis: [1g (AA) + 2g (PA)] / 100g caseína.
 Tratado con carbón activado: [2.95g (CA)] / 1g caseína
 Se indica con la flecha el volumen de elución de los estándares:
 1) Albúmina sérica bovina (PM 67,000)
 2) Tirosil-tirosil-tirosina (PM 507.57)
 3) Triptofano (PM 204.23)

6.7 CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA.

Con la mezcla de solvente cloroformo-acetona (9:1) no se logró obtener una mancha definida y de hecho a pesar de que se hicieron pruebas con altas concentraciones de muestra, nunca se visualizaron las manchas, por lo que no se continuó con esta alternativa, mientras que los resultados de la caracterización de la placa con la mezcla de solventes etanol-agua (63-37) se observan en la **tabla 27**.

TABLA 27
CARACTERIZACION DE LA PLACA

MUESTRA	Rf PROMEDIO
albúmina gramicidina	0.031
tri-tirosina alanilmetionina glicilfenilalanina triptofano alanina fenilalanina	0.843

Observando que los oligopéptidos de alto peso molecular migran una distancia mínima y que de tripéptidos hasta aminoácidos no existe separación entre ellos, con lo cual no se pueden identificar entre sí.

6.7.1 Evaluación de los hidrolizados:

En la **tabla 28** se puede observar para los hidrolizados ácidos de caseína en las siete muestras tomadas durante el proceso, que los picos de elución cercanos al

volumen de elución de la albúmina tienen valores de R_f menores de 0.138 con lo que se corrobora que sean oligopéptidos de alto peso molecular, por otro lado, los picos con volúmenes de elución superiores al volumen de elución de la albúmina tienen valores de R_f semejantes a los valores del tripéptido a el péptido y a los aminoácidos, por lo que pueden ser moléculas de uno, dos o tres aminoácidos.

En la misma tabla podemos observar para el hidrolizado enzimático de caseína con 20 horas de hidrólisis, que en la muestra del primer pico (HE-20-1) se distinguen cuatro manchas seguidas en forma de una línea siendo péptidos de bajo peso molecular o aminoácidos. El segundo pico (HE-20-2) y el tercer pico (HE-20-3) también son péptidos de bajo peso molecular o aminoácidos.

El único pico del hidrolizado enzimático de caseína tratado con carbón activado (HECA-20-1), corresponde a una población homogénea de péptidos de tres aminoácidos o menos.

TABLA 28
VALORES DE "Rf" OBTENIDOS EN LA CROMATOGRAFIA EN PLACA PARA
LOS HIDROLIZADOS ACIDOS Y LOS HIDROLIZADOS ENZIMATICOS DE
PROTEINAS.

MUESTRA	Rf PROMEDIO
HA-1-1	0.133
HA-1-2	0.866
HA-1-3a	0.806
HA-1-3b	0.137
HA-2-1	0.850
HA-2-2	0.806
HA-3-1	0.793
HA-3-2	0.773
HA-4-1	0.812
HA-4-2	0.800
HA-5-1	0.800
HA-5-2	0.800
HA-6-1	0.812
HA-6-2	0.812
HA-7-1	0.812
HA-7-2	0.812
HE-20-1	0.718
	0.656
	0.565
	0.312
HE-20-2	0.500
HE-20-3	0.812
HECC-20-1	0.793

6.8 CARACTERISTICAS DEL PRODUCTO

La caracterización del producto puede realizarse comparando el patrón de aminoácidos del mismo contra el recomendado por la FAO o bien contra el patrón de los productos comerciales existentes. La **tabla 29** muestra esta comparación especifi-

camente con los aminoácidos indispensables.

TABLA 29
COMPARACION DEL PATRON DE AMINOACIDOS INDISPENSABLES EN EL
PRODUCTO DESARROLLADO CONTRA EL RECOMENDADO POR FAO Y EL
DE PRODUCTOS COMERCIALES.

AMINOACIDO	% AMINOACIDO			
	P.D. (1)	FAO (1973)	LOFENALAC (2)	MILUPA (2)
His	3.8	3.9	3.5	5.1
Ile	11.1	9.7	10.1	12.6
Leu	23.2	22.3	18.8	21.2
Lis	27.0	14.2	20.6	14.8
Met	4.1	5.4	6.6	5.1
Fen	1.7	11.5	1.1	0.0
Tir	2.6	5.8	10.7	12.6
Tre	12.0	12.0	10.5	10.0
Trp	0.0	2.4	2.6	3.7
Val	14.0	12.9	15.5	14.8
total	100.0	100.0	100.0	100.0
(1) producto desarrollado.				
(2) valores calculados en base al contenido declarado por los fabricantes.				

Como se esperaba, el proceso de adsorción de fenilalanina efectuado al hidrolizado de caseína, resultó en la pérdida parcial de histidina y metionina y en la casi total pérdida de tirosina y triptofano, por lo que tuvieron que ser adicionados al producto para ser recuperados, y a su vez tenga un patrón similar al de los productos comerciales. En la **tabla 29** se muestra el patrón de aminoácidos del producto desarrollado si se complementara con 57 mg de aminoácidos indispensables por 1,000 mg

de aminoácidos del producto desarrollado, en donde la tirosina representa el 50% del total de aminoácidos a suplementar., los otros serían el 18% de triptofano, el 15% de valina, el 11% de metionina y el 6% de histidina.

Se puede observar que después de complementado el producto, el patrón de aminoácidos obtenido, es similar al que presentan los productos comerciales.

De acuerdo a la **tabla 7**, el requerimiento de aminoácidos indispensables puede ser cubierto consumiendo 2 g de proteína al día por g de peso del niño, en forma de proteínas de huevo o de leche. El patrón de aminoácidos indispensables del producto complementado (**tabla 30**), sería cubierto teóricamente con 2.56 g del hidrolizado desarrollado y suplementado, con 0% de humedad, lo que en un inicio representaría un aumento del 25% en el consumo de proteínas respecto a proteínas de alta calidad.

TABLA 30
**PATRON DE AMINOACIDOS DEL PRODUCTO DESARROLLADO POS-
 TERIOR A LA ADICION DE AMINOACIDOS PERDIDOS EN EL PROCESO DE
 ADSORCION.**

AMINOACIDO	% AMINOACIDO			
	LOFENALAC	MILUPA	(1)	(2)
His	3.5	5.1	4.1	3.3
Ile	10.1	12.6	9.0	---
Leu	18.8	21.2	18.8	---
Lis	20.6	14.8	21.9	---
Met	6.6	5.1	5.4	6.2
Fen	1.1	0.0	1.4	---
Tir	10.7	12.6	11.8	28.6
Tre	10.5	10.0	9.7	---
Trp	2.6	3.7	3.5	10.3
Val	15.5	4.8	14.5	8.3

(1) Patrón de aminoácidos del producto desarrollado después de suplementar His, Met, Tir, Trp y Val.

(2) Miligramos de aminoácido suplentado por 1,000 mg. de aminoácidos del producto desarrollado.

6.9 FORMULACION DEL PRODUCTO

La formulación del producto, se definió como la determinación de las relaciones cuantitativas entre los nutrimentos, para la creación de un alimento "completo" que llenase los requerimientos para el desarrollo adecuado de un niño recién nacido.

Se definió la formulación base para el producto final de acuerdo a las disposiciones de la legislación oficial vigente publicada en el *Diario Oficial*, (1988), y en las recomendaciones internacionales del *Codex Alimentarius*, (1981).

La formulación propuesta es la siguiente:

TABLA 31
FORMULACION BASE DE UN ALIMENTO PARA NIÑOS RECIEN NACIDOS
(Diario Oficial, 1988).

NUTRIMENTO	%
Proteína	23.2
Grasas	23.2
Minerales	3.6
Carbohidratos	50.0
Total	100.0

Se determinó que una mezcla preparada de la anterior forma daría 410 Kcal/100 g de producto final. La **tabla 32** enlista los materiales seleccionados para cumplir con estas relaciones y que fueron usados durante las pruebas realizadas en planta piloto por *López, (1989)*.

TABLA 32
FORMULACION PROPUESTA DEL ALIMENTO

NUTRIMENTO	%
Proteína: hidrolizado desarrollado	23.20
Grasa:	
-grasa de leche	14.85
-aceite de maíz	7.42
-emulsificante	0.93
Minerales: mezcla de sales	3.60
Vitaminas: premezcla de vitaminas	trazas
Carbohidratos: maltodextrina	50.00
Total	100.00

6.10 ELABORACION DEL PRODUCTO DESARROLLADO

Al realizar las pruebas en planta piloto, se modificó la forma en que se realizaban los hidrolizados de caseína en el laboratorio (López 1989).

Las condiciones del proceso de hidrólisis se resumen en la **tabla 33**, así como se describe a continuación:

1. La dispersión del caseinato de sodio en agua a 50 °C a una concentración del 5%. Se agrega la enzima Amano 2A y empieza a correr el tiempo de hidrólisis. A los 5 minutos se agrega la enzima Papaína. A los 30 minutos se agrega el resto del caseinato de sodio lo que pone a la solución viscosa. Se mantiene la misma temperatura por 20 horas en que se alcanza una concentración de 16 mg de fenilalanina/g proteína. El producto adquiere una apariencia opaca de color café claro y fuerte sabor amargo. Las enzimas son inactivadas térmicamente a 90 °C por 10 a 15 minutos. La solución se deja enfriar a temperatura ambiente.
2. La separación de fenilalanina se realiza por adsorción con carbón activado a 400 rpm durante 40 minutos y se espera a que sedimente el carbón activado, separándose el líquido de las partículas por decantación. Al líquido resultante se le adiciona filtroayuda en forma de lechada al 5-10% para luego separar el carbón residual por centrifugación. La solución resultante es clara con ligera coloración amarilla y con un contenido de sólidos de 4.5%(P/P) y sin sabor amargo.

-
3. La solución obtenida es formulada y secada con el fin de obtener un producto con un valor nutricional semejante al de la leche, así como una presentación como la de la leche en polvo. Para lo anterior, La solución obtenida es adicionada de grasas que son emulsificadas con el monoestearato de glicerilo y la lecitina y se usa el algarrobo (fundido) como espesante, a una temperatura de 50°C y con agitación vigorosa. Se obtiene una solución con un contenido de sólidos del 9%. Se seca por aspersión, sin haberse aún determinado el % de humedad final. Entonces se le agregan los carbohidratos, sales y vitaminas. El producto final es un polvo blanco menos opaco que la leche. 4. Se hicieron unas pruebas preliminares de envasado, determinándose que el producto es estable hasta por 2 meses si:

a) se encontraba en ausencia de luz

b) se encontraba en una atmósfera de nitrógeno si la humedad es mayor del 5%.

c) se encontraba en una atmósfera sin nitrógeno si la humedad es menor del 5%.

4. El costo del producto terminado se estima de 35,300 pesos¹ de producto terminado comparando con el costo de 34,600 pesos² del producto LOFENALAC en E.U., sin considerar los costos de importación, se observa que es competitivo comercialmente. Se estimó también la demanda del

1 a Enero de 1989 en adquisición al menudeo.

2 de 1986. (\$2,500/dólar).

producto siendo la que se muestra en la tabla 34 en la cual se considera que el promedio de consumo del producto en un niño durante sus primeros diez años de vida es de 7.6 g producto/día/Kg peso (López, 1989).

En la figura 28 se tiene el diagrama de bloques del proceso propuesto, lo que enfatiza lo dicho anteriormente.

TABLA 33

LA ELABORACION DEL PRODUCTO DESARROLLADO EN ESTE PROYECTO.

PARAMETRO	VALOR
<p>*Hidrólisis enzimática* -sustrato -enzimas -concentración de sustrato [S] -relación [E/S] -temperatura -tiempo de reacción -agitación -recipiente</p>	<p>caseína Amano 2A-Papaína 10% 1%-2% 50°C 20 horas 150 rpm cilíndrico sin baffles</p>
<p>*Inactivación enzimática* -temperatura -tiempo</p>	<p>90°C 10-15 min</p>
<p>*Adsorción* -adsorbente -fabricante -forma física -concentración de adsorbente -agitación -tiempo de contacto -temperatura de operación</p>	<p>carbón activado DGR 8X30 clarificantes mexicanos granular 2.95 g CA/g proteína 400 rpm 40 min 20°C</p>

TABLA 34
PRONOSTICO DE DEMANDA DEL ALIMENTO BAJO EN FENILALANINA
PARA EL PERIODO 1990-1997 (López, 1989).

Producto/año	PRONOSTICO Kg/año				
	1990	1991	1992	1993	1997
Alimento bajo en fenilalanina.	3300	9540	15780	22020	46980

DIAGRAMA A BLOQUES DEL PROCESO PROPUESTO

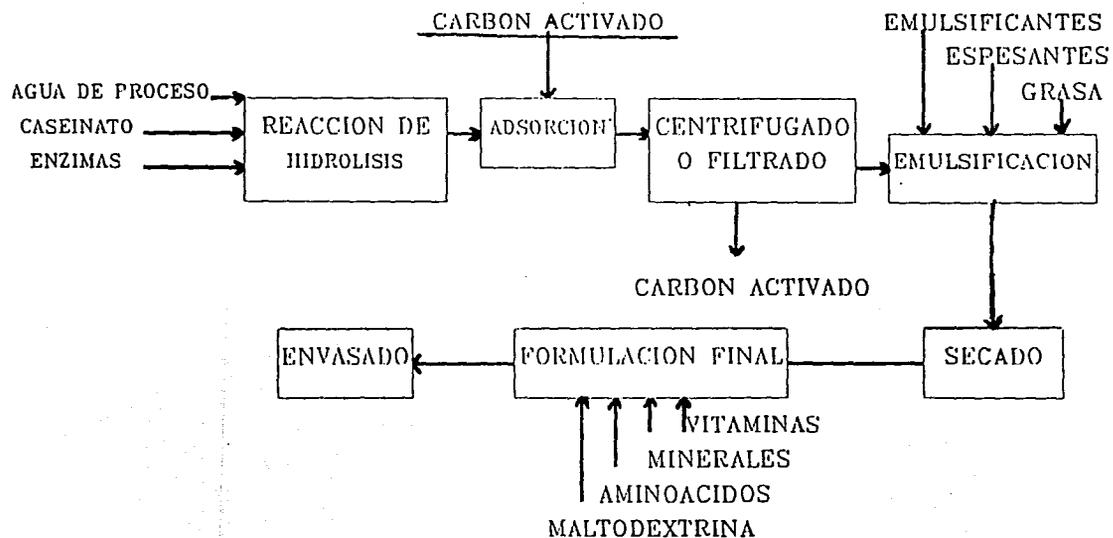


FIGURA 28

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

-
1. Se eligió a la caseína como materia prima para la elaboración del alimento bajo en fenilalanina, por ser técnica y económicamente viable.
 2. Se desarrolló un proceso enzimático para hidrolizar la caseína y hacer posible la separación de la fenilalanina.
 3. Se probó la técnica de separación de la fenilalanina con carbón activado desarrollada en otra etapa de este proyecto en diversos hidrolizados enzimáticos a fin de establecer las condiciones óptimas del proceso.
 4. Se formuló el alimento como una fuente proteica, pobre en fenilalanina y con nutrimentos necesarios para el desarrollo adecuado de los lactantes fenilcetonúricos.
 5. Se caracterizó el alimento bajo en fenilalanina obtenido por hidrólisis enzimática de caseína, útil como sustituto de leche como alimento principal en niños con fenilcetonuria.
 6. El hidrolizado ácido de proteínas con un tiempo de hidrólisis de 7 horas aún no llega a ser un producto compuesto de aminoácidos libres, compuesta la población más pequeña por estructuras formadas por más de tres aminoácidos.
 7. En la tercera hora de hidrólisis de proteínas se logra romper a la proteína, obteniéndose oligopéptidos de más de tres aminoácidos.

-
8. A partir de la quinta hora de hidrólisis ácida de proteínas, no se mejora el hidrolizado, por lo que se descartó la hidrólisis ácida de proteínas como alternativa para este proceso.
 9. El hidrolizado enzimático de caseína está formado por oligopéptidos de alto peso molecular, por tripéptido, dipéptidos y por aminoácidos.
 10. En el hidrolizado enzimático de caseína, tratado con carbón activado, se eliminan los aminoácidos aromáticos, obteniéndose una población homogénea de oligopéptidos formados por más de tres aminoácidos.
 11. Se propone evaluar geles con grados mayores de entrecruzamiento como "Sephadex G-15 ó G-10 para la cromatografía en columna, así como evaluar otras mezclas de solventes que permitan una mayor separación de los componentes de la mezcla desconocida en la cromatografía en capa delgada. Evaluar la homogeneidad del producto obtenido por hidrólisis enzimática con pruebas "in vivo". Evaluar el hidrolizado ácido de caseína con un tiempo mayor de hidrólisis, observando los inconvenientes de su realización, para poder tenerlo como una alternativa de la liberación específica de fenilalanina en proteínas.

8 BIBLIOGRAFIA

-
- Abbot, D. y Andrews, R. S. (1965),. *An Introduction to Chromatography*. Ed. Longmans, Gran Bretaña.
 - Acosta, P.B.; Wenz, E. (1977), *Diet Management of PKU*, US. Depto. of Health Education and welfare.
 - Adler-Nissen, J. (1986), *Enzymic Hydrolysis of food Proteins*. Elsevier, Gran Bretaña, cap. 1-5.
 - Anónimo (1980), *Medical Foods, Reference Manual: MILUPA*, Milupa Corporation, Product Monograph, 1-67.
 - Anónimo (1986a), *Pediatric Products Handbook: PHENYL-FREE*, Edition, Mead Johnson Nutritional Division, USA, 27-31.
 - Anónimo (1986b), *Pediatric Products Handbook: LOFENALAC*, Mead Johnson Nutritional Division, USA.
 - AOAC: *Official Methods of Analysis of Association of Analytical Chemists*. (1975), Published By The AOAC 12a. Edición. Washington, D. C.
 - Baduñ D. S. (1988), *Diccionario de Tecnología de los Alimentos*. Ed. Alhambra-Mexicana, México, D. F.
 - Bickel, H. (1980), *Fenilketonuria: Present, Past and Future*. J. Inher. Metab. Dis. 3.
 - Bohinski, R. (1978), *Bioquímica*. Fondo Educativo Interamericano. México D.F.
 - Chávez, A. y Martínez, C. (1979), *Nutrición y Desarrollo infantil*. Ed. Interamericana, , México D.F.
 - Cederbaum, S. D. (1984), *Genetic Factors in Nutrition*, Academic Press, 79-91.
 - Codex Alimentarius (1981), *Codex Standard for Infant Formula*, Codex Stan. 72-1981, Part. II.
 - De Chávez, M. (1969), *Evaluación sobre la aceptación, Tolerancia y Manejo de un nuevo alimento Infantil*. Revista Tecnología de Alimentos, 4(5).

-
- D. I. Edwards. (1975), *Cromatografía: Principios y Técnicas*. Ed. El Manual Moderno, S.A., México D.F.
 - Diario Oficial de la Federación (1988), *Alimentos para lactantes y niños de corta edad*. Primera Sección, Título XI, Cap. I, Fórmula para lactantes, Art. 733, Lunes 18 de Enero de 1988, 82-84.
 - Davison, S. (1979), *Human Nutrition and Dietetics*, Crurchil Livingston, Londres, 316.
 - Eaker y Porath (1967), *J. Sorption Effects in Gel Filtration. I Survey of Aminoacids Behavior on Sephadex G-10*, Sep Science, 2(4): 507.
 - FAO (1970), *Contenido de Aminoácidos en Alimentos y Datos Bibliográficos de Proteínas*, FAO, Roma.
 - FAO (1973), *Energy and Protein Requirements*, Reporte Conjunto FAO/WHO, World Health Organization, Techn. Rep. Ser. 522, WHO.
 - Fisher y Bender. (1976), *Valor Nutritivo de los Alimentos*. Ed. Limusa, México, D.F.
 - Fischer, L. (1975), *Introducción a la Cromatografía en Gel. Técnicas de Laboratorio en Bioquímica y Biología Molecular*. Ed. El Manual Moderno, S.A., México, D.F.
 - Folin, O. y Ciocalteu, V. (1946), *Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent*, J. Biol. Chem., 163, 633.
 - Fomon, S.J. (1976), *Nutrición Infantil*. 2a. Edición. Ed. Interamericana. México, D.F.
 - Greenberg, N. A. y Shipe, W. F. (1979) *J. Food Sci.*, 176, 367-369.
 - Greenstein, J. P. y Winitz, M. (1961), *Chemistry of Aminoacids*, Wiley, USA, Cap. 34.
 - Gordon, A. H. y col. (1941), *The Partial Hydrolysis of some Proteins, with Special Reference to the mode of linkage of the basic aminoacids*. Biochem. J. 35, 1369-87.

-
-
- Harper, W. y Col. (1978), *Manual de Química Fisiológica*. Ed. El Manual Moderno, S.A., México, D.F.
 - Hall, L. A. (1949), *Pressure Hydrolysis of Proteins*. Food Technol. 3, 51-6.
 - Harris, J. I., Cole, R. D. y Pon, N. G. (1956), *Kinetics of Acid Hydrolysis of Dipeptides*. Biochem. J. 62 154-59.
 - Hill, R.L. (1965), *Hidrolisis of Proteins*, Adv. Protein Chem., 20, 37-107.
 - Holum, J. R. (1986), *Principios de Fisicoquímica, Química Orgánica y Bioquímica*. Ed. Limusa, México, D. F.
 - Karambelkan, P. V., Ramasarna, G. B. y Screenwasan, A. (1950), *Hydrolysis of Protein*. Indian 40, 928 Jan 11.
 - Lara, P.C. (1988), *Desarrollo de un Alimento bajo en Fenilalanina I. Hidrólisis Enzimática de Proteínas*. Tesis Maestría en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México.
 - Lehninger, A. L. (1986), *Biochemistry*. By Worth Publishers, Inc. New York.
 - López, B. J. (1989), *Desarrollo de un Alimento bajo en Fenilalanina II. Separación de Fenilalanina de un Hidrolizado de Proteínas*. Tesis Maestría en Ingeniería de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México.
 - López-Munguía, C. A. y Quintero, R. R. (1987), *Tecnología Enzimática: Aplicaciones en Alimentos y Medicina*. UNAM, México, D. F.
 - Mahler, H. R. y Cordes, E. H. (1971), *Química Biológica*. Ediciones Omega, Barcelona, España.
 - Manual del Fabricante. (1986), *LKB*. Suecia.
 - Manual del Fabricante. (1988a), *Pronasa*. Calbiochem. EUA.
 - Manual del Fabricante. (1988b), *Amano 2A*. Amano Int. Enzyme Co. Inc. EUA.
 - Manual del Fabricante. (1988c), *HT proteolitic 200*. ENMEX S.A. de C.V., México D. F.

-
- Manual del Fabricante. (1988d), *Papaína*. Hevi, S. A., México D. F.
 - Marecek, V. y Kozich, K. (1956), *Hydrolysis of some Proteins with strong Acids*. Chem. Listy 50, 1174-9.
 - Mazur y Harrow. (1973), *Bioquímica Básica*. Ed. Interamericana, México, D. F.
 - Meister A. (1965), *Biochemistry of Aminoacids*, Academic Press, USA.
 - Mc. Caman, M. V. y Robins, S. E. (1962), *Fluorometric method Determination of phenilalanine in serum*, J. Lab. Clin. Meth., 59, 885.
 - Mondolfo, U. y Camboni, V. (1950), *Hydrolysis of Proteins for Liberation of Eighteen Aminoacids*. Boll 1st. Sieroterap Milan 29, 148-60.
 - Nakazim, K. e Ikeda, M. (1941), *Hydrolysis of Proteins at High Temperatures and Presseres*. J. Japan 17, 29-30.
 - Nuño, M. (1977), *Cromatografía en Capa Delgada*. Internacional Científica S. A., México, D. F.
 - Partridge, S. M. (1949), *Isolation of L-phenylalanine from a protein hydrolysate*, Biochem. J. 44 521.
 - Robinson, C. H. (1979), *Fundamentos de Nutrición Normal*. Cía Editorial Continental, S. A. México, D. F.
 - Schmidt, M. S. (1944), *The Chemistry of Aminoacids and Proteins*. Edited By Carl L. A. Ph. D. EUA.
 - Sephadex, (1977), *Gel Filtration in Theory and Practice*, Pharmacia Fine Chemicals, Suecia.
 - Strocci, P. M. (1954), *Acid Hydrolysis of Proteins*. Ann. Chim (Rome) 10, 827-35.
 - Snell and Snell (1956), *Colorimetric Methods of Analysis*, Vol. 4, Van Nostrand Co.
 - Toshikazu, I. y Col. (1984), *Aminoacid Manufacture by Protein Hidrolysis*. JP 60,192,569 [85, 192,569] (Cl A23L1/227) 01-Oct.-1985.

-
- UTBON: (1983), *Unidades de Temas Básicos para la Orientación Nutricional*, Dir. Gral. de Educación para la Salud. Dir. de Area de Programas, Investigación y Capacitación. Depto. de Nutrición. Patronato Nacional de Promotores Voluntarios, S.S.A., México, D. F.
 - Velázquez, A. A. (1987), *La Herencia en la Nutrición*. Cuadernos de Nutrición, Vol. 10(3). INN. México, D. F.
 - Velez Pratt G. (1986), *Manual de vías Metabólicas*. Facultad de Química, UNAM.
 - Whitaker, J. R. (1972), *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker, Inc. EUA.
 - White, A., Handler, P. and Smith, L. E. (1964), *Principios de Bioquímica* Ed. El Castillo, S. A. Madrid, España.
 - Williams, H.H. (1961), *Diferences Between Cows and Human Milk*. *Jama* 175: 104.
 - Wilson, E., Fisher, H. K. y Fugua, E. M. (1978), *Fisiología de la Alimentación*. Ed. Interamericana, México, D. F.
 - Zhigalov, V. P. (1949), *Hydrolysis of meat Protein and Gluten With Active Proteolytic Enzymes and Hydrochloric acid*. *Myasnaya Ind.* 20, 4 86-8.