

00567

rej^o
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"DESARROLLO DE UN ALIMENTO BAJO EN FENILALANINA
II. SEPARACION DE FENILALANINA DE UN HIDROLIZADO DE PROTEINA"

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIA DE ALIMENTOS
(INGENIERIA DE ALIMENTOS)

P R E S E N T A E L:

I.Q. LUIS JOEL LOPEZ BAJONERO

MEXICO D.F.

1989

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Resumen

En el presente estudio se describe un proceso para la producción de un alimento de bajo contenido en fenilalanina. Esta investigación forma parte del Programa Nacional de Prevención del Retraso Mental de Origen Metabólico e intenta, mediante un desarrollo tecnológico, satisfacer la demanda de alimentos por parte de los recién nacidos en los cuales se manifieste el pedecimiento genético conocido como "Fenilcetonuria", causado por la deficiencia en la enzima fenilalanina hidroxilasa. La prueba de sangre, que se está aplicando a un número cada vez mayor de recién nacidos, tanto en hospitales públicos como privados, permitirá detectar del orden de 100 a 150 casos anuales en el país. Cuando en un recién nacido se detecta la enfermedad, una dieta controlada en fenilalanina le permite un desarrollo casi normal. De no ser así, el recién nacido sufrirá de un severo retraso mental. La baja disponibilidad y el alto costo de este tipo de productos, no elaborados en México,, generaron este estudio, con el fin de que las instituciones de salud, dispongan en un futuro próximo, del alimento necesario para la demanda esperada.

El proceso consistió en partir de caseína como materia prima y efectuar un extenso proceso de hidrólisis enzimática, tendiente a liberar de forma específica a la fenilalanina, seguido de una separación del aminoácido mediante un proceso de adsorción. Finalmente el producto fue formulado, homogenizado y secado. El desarrollo ha sido efectuado hasta nivel planta piloto.

ABSTRACT

The present paper describes the process for the production of a low phenylalanine food. This research is a part of the National Mental Retardation Prevention Program from methabolic origin and intent, by a technological development, to satisfy the food demand by the newborns which manifest the genetic disease known as "Phenylketonuria" (PKU), that has been shown to be due to a deficiency of the enzyme phenylalanine hidroxilase. The blood test, that has been applied to a increasing number of newborns, in public and private hospitals, will permit to detect about 150 cases yearly around the country. The only proved treatment of a patient of PKU is a controled phenylalanine intake. If the phenylalanine intake is not controled the patient will manifest profound mental retardation at the end of the first year of life.

The project was conceived to satisfy the future demand of this type of products (not produced in Mexico), because its low disponibility and high price.

The process consist of a extensive enzymatic hydrolysis of casein, trying to liberate phenylalanine specifically, and a separation of the aminoacid by an adsortion process. Finally, the product was formulated, homogenized and dried. The process has been proved to a pilot plant scale.

Abreviaturas

A.A. o a.a.	aminoácido(s)
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
Asp	ácido aspártico
Cis	cisteína
Gli	glicina
Gln	glutamina
Glu	ácido glutámico
Fen	fenilalanina
His	histidina
Ile	isoleucina
Leu	leucina
Lis	lisina
Met	metionina
Pro	prolina
Ser	serina
Tir	tirosina
Tre	treonina
Trp	triptófano
Val	valina
BH	biopterina
°C	grados centígrados
C.A.	carbón activado
DHFR	dihidropterina reductasa
E/S	relación enzima-sustrato
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
g	gramos
hr	horas
Kcal	kilocaloría
Kg	kilogramo
l	litros
mg	miligramos
M	concentración molar
min	minutos
ml	mililitros
mM	concentración milimolar
N	concentración normal
N.D.	no determinado
nm	nanómetros
PH	fenilalanina hidroxilasa
P/P	peso en peso
P/V	peso en volumen
rpm	revoluciones por minuto
S	concentración de sustrato
T	temperatura
t	tiempo
TCA	ácido tricloroacético
UV	ultravioleta
μ	viscosidad
μ g	microgramo

INDICE

Capítulo I Introducción	
1.1 Antecedentes	1
1.2 Descripción del proyecto	2
Capítulo II Generalidades	
2.1 Fenilcetonuria	4
2.2 Dietas para fenilcetonúricos	8
2.3 Fenilalanina	15
2.4 La leche y sus componentes	20
2.5 Procesamiento de productos lácteos	23
2.6 Hidrólisis de proteína	24
2.7 Adsorción. Consideraciones teóricas	28
Capítulo III Materiales y Métodos	
3.1 Plan de trabajo	37
3.2 Materiales	39
3.3 Metodología	39
Capítulo IV Resultados	
4.1 Método de separación de fenilalanina del hidrolizado enzimático	54
4.2 Pruebas preliminares	54
4.3 Adsorción con carbón activado	58
4.4 Hidrolizados de proteína	74
4.5 Eliminación de fenilalanina de hidrolizados de proteína	81
4.6 Características del producto	86
4.7 Formulación del producto	88
4.8 Pruebas a escala planta piloto	89
4.9 Evaluación económica preliminar	93
4.10 Proceso propuesto	95
Conclusiones	101
Referencias	102
Anexo I	107

CAPITULO I Introducción

1.1 Antecedentes

La fenilcetonuria es una de las cerca de 300 enfermedades hereditarias que tienen como elemento común, un trastorno de alguno de los múltiples procesos bioquímicos que continuamente se llevan a cabo en el organismo. Las enfermedades que conforman este grupo se conocen como errores innatos del metabolismo, nombre con el que las designó su descubridor Sir Archibald Garrod (Velázquez, 1987).

Como tal, la fenilcetonuria es un error innato en el metabolismo del aminoácido fenilalanina, cuya manifestación clínica más severa es el retraso mental en los pacientes que la padecen (Cederbaum, 1984), ocasionado por deficiencias en la enzima fenilalanina hidroxilasa, responsable de la transformación de fenilalanina en tirosina.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha en torno a la fenilcetonuria, se han enfocado prácticamente hacia la obtención de beneficios a través del diagnóstico y tratamiento temprano de la enfermedad; esto es, prevenir una forma hereditaria del retraso mental. Sin embargo, la fenilcetonuria no se ajusta al modelo convencional de causa-remedio de las enfermedades infecciosas o nutricionales, sino que es una enfermedad genética para la cual no existe hasta la fecha solución y el tratamiento consiste en mantener bajos los niveles sanguíneos de fenilalanina para evitar la manifestación de sus consecuencias.

Las consecuencias de esta enfermedad no pueden cuantificarse. El retraso mental que sufre el fenilcetonúrico y los efectos emocionales en su medio son lamentables e irreversibles. Los costos para la sociedad son evidentemente altos. Por estas razones la orientación y educación de los futuros padres, así como los programas tendientes a la detección temprana de este y otros padecimientos es urgente, sobre todo si se considera que la detección de la enfermedad es muy simple (desde el punto de vista analítico) y rescatará a un ser humano del retraso mental.

La fenilcetonuria constituye un ejemplo de enfermedad genética que puede tratarse si se descubre en el recién nacido y se mantiene al infante con una dieta controlada durante los primeros años de vida. De esta manera el niño puede llegar a ser un adulto normal.

Por otro lado la detección y el tratamiento son altamente costosos: pero más costoso aún resulta el no efectuar el diagnóstico y el tratamiento de los niños fenilcetonúricos a tiempo (Lenhinger, 1986). Velázquez (1987), estimó que en el caso de México, el estudio necesario para la detección de un caso positivo de fenilcetonuria en 10 mil niños recién nacidos, podría costar del orden de 5,000 dólares (si el estudio se hiciera conjuntamente para detección de hipotiroidismo, otro mal congénito), a los cuales habría que sumar 7,100 dólares del

tratamiento con alimento especial, durante los primeros ocho años de vida, es decir 12,000 dólares en total. Considerando los gastos por concepto de escuela especial y atención médica durante los 20 años promedio de vida del fenilcetonúrico (19,200 dólares), el beneficio de la detección y tratamiento oportuno es de 7,100 dólares.

Como consecuencia de lo antes expuesto, se creó el Programa Nacional de Prevención del Retraso Mental, entre la Universidad Nacional Autónoma de México y el Sector Salud. El proyecto tiene como sede el departamento de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), localizado en el Instituto Nacional de Pediatría en la Ciudad de México. El programa tiene entre otras funciones, la implementación institucional de la prueba de detección de la enfermedad y el tratamiento de los casos positivos, que se estima serán alrededor de 150 anualmente.

Sin embargo, existen ciertas limitaciones en la implementación de dicho programa, específicamente en la disponibilidad de alimentos libres de fenilalanina. La baja disponibilidad en México y su alto costo resultan barreras para pacientes de escasos recursos. Por estas causas se concertó el presente proyecto, cuyo objetivo es desarrollar una tecnología para la producción de un alimento bajo en fenilalanina, para ser usado como base en la alimentación de fenilcetonúricos.

El desarrollo del proyecto está contemplado en dos fases: la primera consiste en seleccionar una proteína de base y llevar a cabo una hidrólisis enzimática extensa. La segunda, motivo de este trabajo, en particular, consiste en la separación del aminoácido y la optimización global del proceso.

1.2 Descripción del proyecto

Como se mencionó anteriormente, la finalidad del presente proyecto es desarrollar un proceso para obtener un producto idóneo para ser suministrado a los niños que padecen fenilcetonuria. Por las características del proyecto, se decidió realizarlo en dos etapas.

En la primera etapa del proyecto se determinarían las condiciones óptimas que permitiesen liberar la mayor proporción de fenilalanina en forma de aminoácido libre, a partir de una proteína de buen valor nutricional, alta disponibilidad y bajo costo, por medio de una hidrólisis enzimática. Esta etapa fue llevada a cabo por Lara (1988). La conclusión a la que llegó fue:

"Las mejores condiciones que se obtuvieron para la liberación de fenilalanina de la proteína de leche fueron: hidrólisis enzimática de leche descremada al 5% de proteína (P/V), primero con la enzima proteolítica AMANO 2A a 50°C, durante 5 horas al 1% E/S y una segunda etapa con la enzima PRONASE (mezcla de enzimas endo y exoproteolíticas), a 40°C durante 24 horas a una relación

de 0.75% E/S, obteniéndose una liberación de 27.6 mgFen/(g de proteína), de un valor original de 52.4 mgFen/(g de proteína)."

En la segunda parte del proyecto, objeto de esta tesis, se determinaron las condiciones de separación de la fenilalanina a partir del hidrolizado de leche, con el fin de eliminar este aminoácido.

Una vez optimizada la etapa de separación, se efectúan los balances correspondientes para la definición global del proceso.

Algunos aspectos de la hidrólisis enzimática son reconsiderados al introducir el factor económico, lo que lleva a una sustancial modificación de las condiciones de hidrólisis.

Una vez definida la secuencia reacción enzimática-separación de fenilalanina, se efectúan la caracterización y formulación del producto terminado, así como una evaluación económica preliminar.

Finalmente se efectúan pruebas a nivel piloto.

CAPITULO II Generalidades

2.1 Fenilcetonuria

2.1.1 Origen de la enfermedad.

La proteína ingerida por un organismo vivo, para su digestión sufre proteólisis y los aminoácidos liberados se acumulan en las "pozas" (pools) respectivas del organismo. Simultáneamente, las proteínas del organismo son separadas en sus constituyentes acumulándose en las "pozas" junto con las moléculas recién formadas de aminoácidos, en aquellos organismos en los cuales ocurre biosíntesis. Una vez que las moléculas de aminoácidos de estas fuentes han entrado en sus "pozas", son indistinguibles.

A partir de estas reservas, los aminoácidos son usados en síntesis de nuevas proteínas y degradación u otras transformaciones metabólicas. En un organismo totalmente desarrollado y en estado estable, se metabolizan todos los aminoácidos que son ingeridos y/o biosintetizados (Algliesh, 1956).

En una dieta normal se pueden ingerir de 2 a 3 veces más fenilalanina que la requerida para mantener un balance positivo y de síntesis de proteína para el crecimiento y la renovación celular. La mayor parte de este exceso, es hidroxilado para formar tirosina y posteriormente metabolizado hacia otros sustratos del metabolismo energético. La hidroxilación de fenilalanina, es sabido con certeza, que ocurre en el hígado y pudiera ocurrir también en los riñones. Sin embargo existen en el hombre otras rutas del metabolismo de fenilalanina, que carecen de la capacidad para manejar el exceso ocasionado por deficiencias en la hidroxilación de fenilalanina en el hígado.

La hidroxilación de fenilalanina (Figura 2.1), ocurre a través de un paso de p-hidroxilación catalizado por la enzima L-fenilalanina-4-monooxigenasa (EC 1.14.16.1), también llamada fenilalanina hidroxilasa.

Se han encontrado defectos enzimáticos de severidad variable en cada componente del sistema de hidroxilación de fenilalanina (Tabla 2.1), que son conocidos médicamente con el nombre de hiperfenilalaninemias.

La forma más frecuente y de significancia clínica de hiperfenilalaninemia es la clásica "Fenilcetonuria", descrita en 1934 por el médico noruego Ashbörn Fölling. La enfermedad es debida a una profunda deficiencia en la actividad de la fenilalanina hidroxilasa. Como consecuencia de esta deficiencia, la fenilalanina se acumula en la sangre hasta niveles de 20mg/100ml (10 veces el valor normal) y en menor grado en los tejidos. El exceso de fenilalanina, activa o ayuda por sí mismo a rutas metabólicas secundarias, lo que provoca un fuerte aumento en los niveles en plasma y orina de ácido fenilpirúvico y en

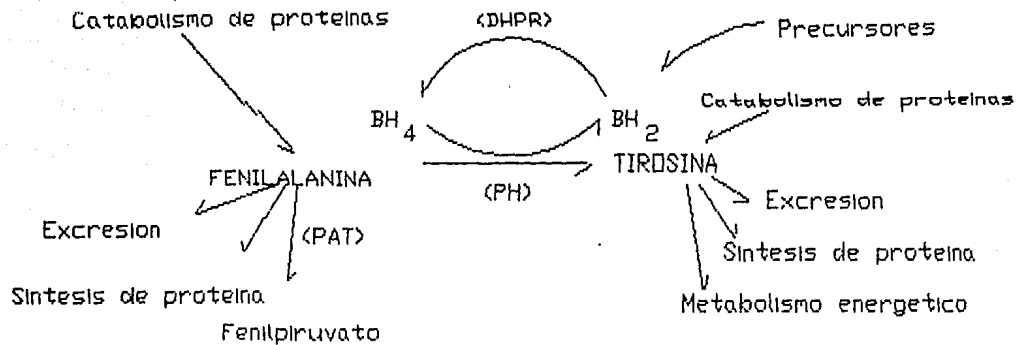


Figura 2.1 Representacion esquematica de la hidroxilacion de fenilalanina (Cederbaum,1984).

Tabla 2.1 Formas clínicas y bioquímicas de hiperfenilalaninemias.
(Cerderbaum,1984).

Nombre	Defecto Enzimático	Aspectos Clínicos	Fenilalanina en suero	Sustratos en orina
Fenilcetonuria clásica	Fenilalanina hidroxilasa	Retraso mental Enfermedades neurológicas Pérdida de pigmentos y excema	Siempre mayor a 20mg/100ml (1.25 mM)	Fenilpirúvato y metabolitos
Hiperfenilalaninemia persistente	Fenilalanina Hidroxilasa parcial	Algunas veces fenotípicamente normal sin terapia	4-20mg/100ml (0.25-1.25mM)	Usualmente normal
Deficiencia dihidropteridina reductasa	Dihidropteridina reductasa	Retraso mental Enfermedades neurológicas progresivas y potencialmente fatal	Casi siempre mayor a 4mg/100ml	Aquellos de fenilcetonuria clásica o hiperfenilalaninemia persistente dependiendo del nivel de Fen. Nivel reducido de neurotransmisores. Dihidrobiopterina elevada.
Defectos sintéticos de biopterina	Defecto enzimático sintético	Igual al anterior	Casi siempre mayor a 4mg/100ml	Igual al anterior pero con nivel alto de biopterina

orina de fenilacetato, fenilacetil glutamina y otros metabolitos (Cederbaum, 1984).

Actualmente es posible la clasificación de hiperfenilalaninemias en término de desviaciones en los constituyentes del sistema de hidroxilación de la fenilalanina. Los fenotipos conocidos incluyen: ausencia de actividad de fenilalanina hidroxilasa (PHx) o actividad deficiente (PH-), ausencia de la actividad de dihidropteridina reductasa (DHPRx) o actividad deficiente (DHPR-) y deficiencia en síntesis de biopterina (BH-).

En el caso del fenotipo PHx, la actividad de la enzima encontrada en los pacientes, es de solamente 0.27% del nivel normal. En el caso del fenotipo PH- la actividad encontrada ha sido mayor a 1% y varía entre 1.5 y 34.5% del valor normal, siendo estos pacientes clasificados como hiperfenilalaninémicos sin fenilcetonuria. Existe un caso, llamado hiperfenilalaninemia maligna, debido a la falta del cofactor de la hidroxilasa de Fen, Tir y Trp, en el que el tratamiento con dieta baja en fenilalanina no detiene el daño neurológico progresivo (Scriver, 1980a).

Los pacientes no tratados son típicamente percibidos como normales en los primeros tres o cuatro meses de vida, después de lo cual se observa un retraso mental progresivo, deterioro neurológico, pérdida de pigmentos (pelo y piel) y desarrollo de excema, provocando en la mayoría de los pacientes retraso mental severo y deterioro en conducta y funciones neurológicas (Cederbaum, 1984).

2.1.2 Detección y prevención del retraso mental.

El tratamiento de la hiperfenilalaninemia es preventivo pero raramente parcial o totalmente curativo. La eficacia de una dieta baja en fenilalanina ha demostrado su efectividad en la prevención del retraso mental, particularmente en los pacientes jóvenes. La detección temprana de la enfermedad con el ensayo de Guthrie de inhibición microbiana en gotas de sangre seca, ha probado ser altamente específico y económico en su implementación con un bajo índice de error. La experiencia sugiere que cuando la detección es planeada y ejecutada apropiadamente, el 95% o más de los casos detectados pueden ser tratados tempranamente.

2.1.3 Tratamiento de fenilcetonuria con dietas especiales.

Aunque se han hecho esfuerzos para desarrollar métodos de tratamiento para la fenilcetonuria, las dietas que restringen o eliminan la fenilalanina, han resultado el único enfoque terapéutico probado.

El objetivo de la dieta es la disminución de los niveles elevados de fenilalanina, dependiendo de esto la disminución de los niveles de metabolitos asociados. Es de mencionar que a pesar de los estudios realizados, aun no se precisa si la fenilalanina

y/o alguno de sus metabolitos actúan como neurotoxina responsable de la fenilcetonuria y de hecho, aun no ha sido aclarado como esa neurotoxina actúa en el organismo.

La fenilalanina constituye alrededor del 5% de la proteína animal y algo menos en las de origen vegetal. Desde el principio fue aparente que un consumo bajo de proteínas no reduciría los niveles de fenilalanina en los pacientes sin causarles desnutrición por deficiencia de otros aminoácidos esenciales. Dado que no existen disponibles grandes cantidades de los L-aminoácidos puros y que además resultan de alto costo, la elaboración de alimentos para fenilcetonúricos formulados con aminoácidos cristalinos no se ha generalizado. Otra alternativa la constituye el tratamiento de proteínas con enzimas proteolíticas, para posteriormente retirar los grupos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) con adsorbentes del tipo del carbón activado. Si estos productos se suplementan con tirosina y triptófano, pueden funcionar como la principal fuente de proteína para el desarrollo de pacientes con fenilcetonuria. Es frecuente que estos alimentos se suplementen con carbohidratos, grasa, minerales y vitaminas, obteniéndose una fórmula completa con todos los nutrientes necesarios. Este es el enfoque que se ha dado a la preparación de fórmulas comerciales para el tratamiento de los fenilcetonúricos (Cederbaum, 1984).

2.2 Dietas para fenilcetonúricos

El objetivo en el manejo de la alimentación del niño con fenilcetonuria, es mantener un nivel de fenilalanina en la sangre que permita el desarrollo total del potencial intelectual, mientras se suministra la proteína y energía adecuadas para el crecimiento óptimo y satisfacción del apetito.

Se deben satisfacer con tal dieta los requerimientos en aminoácidos esenciales, nitrógeno, vitaminas, minerales y agua. Se ha establecido que mantener un nivel de fenilalanina en la sangre de 2 a 10 mg/100ml es suficiente para cumplir con el objetivo evitando así el retraso mental (Acosta, 1977).

Se reconoce a Bickel y colaboradores (1953) como los pioneros en la elaboración de una dieta que permitió el tratamiento de niños fenilcetonúricos en los años cincuenta (Cederbaum, 1984). El enfoque de Bickel, fue el preparar un hidrolizado ácido de caseína, del cual retiró la fenilalanina por medio de carbón activado, técnica que había sido descubierta años antes por químicos alemanes (Bickel, 1980). Posteriormente, Armstrong y Tyler (1955), formularon una mezcla artificial de aminoácidos que también permitió mantener en niveles normales la concentración de fenilalanina en la sangre de niños fenilcetonúricos.

Es a partir de estos enfoques que se han desarrollado alimentos para niños fenilcetonúricos (Bickel 1954, Bickel 1973, Smith 1975, Anónimo 1976, Berry 1976, Parker 1977, Bickel 1979). Algunas de las patentes dedicadas a la producción de alimentos para el tratamiento de la fenilcetonuria se presentan en la Tabla 2.2.

Actualmente el tratamiento clínico de la enfermedad se realiza, mediante fórmulas comerciales con bajo o nulo contenido de fenilalanina.

Tabla 2.2 Alimentos patentados para el tratamiento de Fenilcetonuria.

Principio básico	Método de eliminación de fenilalanina	Patente (*)
Hidrólisis ácida de proteína	Carbón activado	DD 70096
	Filtración en gel	DD 157258
	Carbón activado	DD 211337
Hidrólisis Enzimát.	Cromat. en ciclodextrina	DD 147615
	Filtración en gel	JP 51082791
	Carbón activado	JP 61068426
Mezcla de aminoácidos	-	US 4209531
	-	UK 2038629(1)
Uso de proteínas con bajo contenido de Phe	-	CK 184136(2)
	-	DE 2117243
	-	NL 6611028
	-	JP 59005111
Uso de fenilalanina amoníaco	Destrucción de Fen	JP 58086082
	" " "	JP 73024748

* Referencias: (1) Chem. Abs. 94:197550x, (2) Chem. Abs. 96:121246a. El resto de World Patent Index (1963-1988).

2.2.1 Hidrolizados proteicos comerciales

En Estados Unidos, el producto comercial que ha servido como base para el tratamiento de niños fenilcetonúricos, es un hidrolizado enzimático de caseína, del cual ha sido retirado el 95% de la fenilalanina (Acosta, 1977). El producto conocido en el mercado como LOFENALAC (marca registrada por Mead Johnson, Evansville, Indiana), tiene la característica de ser un alimento nutricionalmente completo por estar formulado para llenar los requerimientos diarios de proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales. La fórmula y composición de LOFENALAC, se dan en las Tablas 2.3 y 2.4, respectivamente.

Los fabricantes del producto aseguran que éste tiene las siguientes ventajas (Anónimo, 1986):

"1. Excepto por su limitado contenido de fenilalanina, LOFENALAC es nutricionalmente completo."

"2. El contenido de fenilalanina de LOFENALAC es suficientemente bajo para permitir flexibilidad en el ajuste del contenido de fenilalanina en la dieta y así llenar los

Tabla 2.3 Formulación de Lofenalac (Acosta,1977).

Nutrimiento	% (P/P)
Hidrolizado de caseína, especialmente procesado *	15
Aceite de maíz	19
Carbohidratos	
Maltodextrinas	46.00
Fécula de arrurruz	8.80
Acido glucónico	2.20
Sacarosa	0.09
Minerales	5
Vitaminas	
Aminoácidos (L-Met, L-Trp, L-Tir)	
Humedad	3

* Este hidrolizado al que se ha retirado la Fen, contiene solamente 0.4% de este aminoácido.

Tabla 2.4 Composición de Lofenalac (Acosta,1977)

Nutrimiento	Valor
	100 g de alimento
Kcalorías	450
Equivalente de proteína (g)	15
Grasa (g)	18
Carbohidratos (g)	57
Aminoácidos	
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-triptófano	0.20
L-treonina	0.81
L-tirosina	0.82
L-valina	1.19
Minerales (mg)	2769.50
Vitaminas (mg)	220.00

requerimientos individuales para el crecimiento del fenilcetonúrico."

"3. Cuando LOFENALAC representa la mayor parte de la dieta, el contenido de fenilalanina en la sangre puede ser efectivamente controlado. Esto permite que los bebés y niños con fenilcetonuria puedan ingerir una variedad razonable de productos naturales, lo que ayuda a desarrollar un interés casi normal en los sabores y texturas de los alimentos ordinarios."

"4. LOFENALAC es bien aceptado por bebés y niños con fenilcetonuria."

Sin embargo, a pesar de tales comentarios, se ha observado en la práctica que presenta las siguientes desventajas:

1. La composición de los aminoácidos de la materia prima original (caseína), se desvía considerablemente de la presentada en la leche materna, la cual es actualmente vista por los expertos como el patrón ideal bajo el cual se debe basar un sustituto proteico para fenilcetonúricos (Nayman,1979). Ver Figura 2.2.

2. Los hidrolizados tienen un contenido residual de fenilalanina (Anónimo,1980).

3. El sabor y olor del hidrolizado enzimático es desagradable a los niños y adultos, aunque es ordinariamente aceptado por los bebés (Acosta,1977)

4. Debido a la formulación, cuando el producto es suministrado en dosis altas por necesidad del tratamiento, provoca que los pacientes tengan exceso de peso por el alto consumo de grasas y carbohidratos.

5. El ácido clorhídrico (en el caso de los hidrolizados ácidos) usado en el proceso, intensifica el sabor desagradable y penetrante del hidrolizado, resultando el bien conocido problema de falta de aceptación del producto por los pacientes.

6. También el caso de los hidrolizados ácidos, éstos contienen cantidades considerables de minerales, en particular de cloruro de sodio, los cuales intensifican el sabor desagradable. El exceso de minerales, en algunos casos, también han provocado desbalance ácido-base (Anónimo,1980).

7. LOFENALAC puede resultar difícil de mezclar, requiriendo en algunos casos el tener que calentar a ebullición la mezcla mientras se agita (Anónimo,1986).

2.2.2 Mezclas comerciales de L-aminoácidos

En el caso de productos comerciales basados en mezclas sintéticas de L-aminoácidos, se tienen en el mercado tres

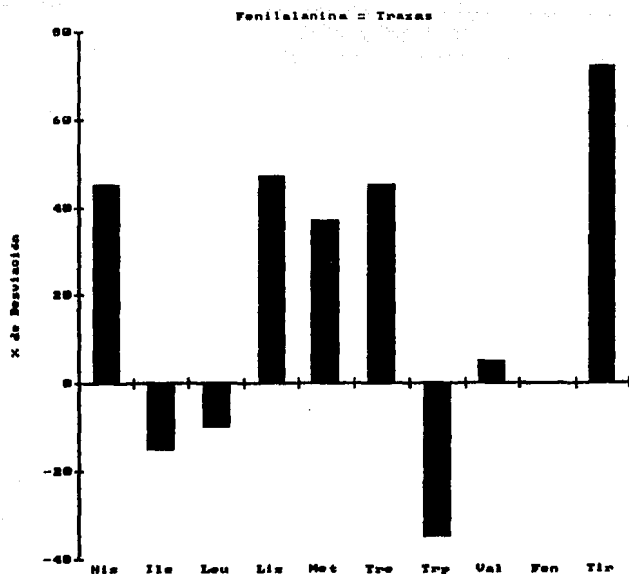


Figura 2.2 Perfil que muestra la desviación con respecto a la leche materna en el contenido de aminoácidos en hidrolizados de caseína de donde se ha eliminado Fen (Nayman,1979).

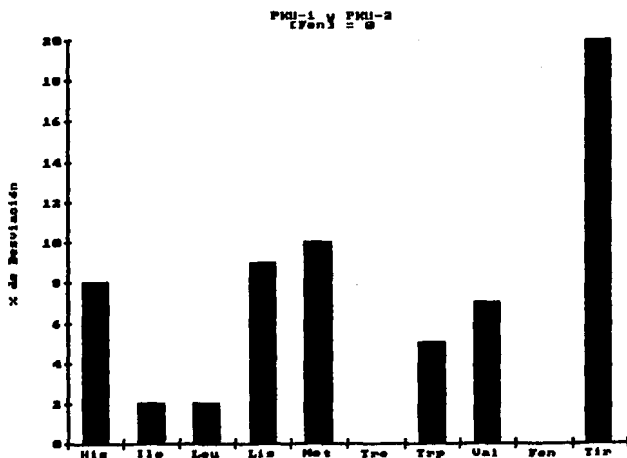


Figura 2.3 Perfil que muestra la desviación con respecto a la leche materna en el contenido de aminoácidos de los productos Milupa PKU1 y PKU2 (Nayman,1979).

productos: PHENYL-FREE (marca registrada de Mead Johnson), MILUPA PKU-1 y MILUPA PKU-2, producidos por MILUPA AG (Alemania Occidental).

PHENYL-FREE, es un alimento libre de fenilalanina diseñado para eliminar el consumo de fenilalanina. El uso de PHENYL-FREE permite una gran variedad de otros alimentos que suplementen fenilalanina y complementen las necesidades calóricas, ya que contiene menos calorías que LDFENALAC. El producto ha sido probado en niños de 2 a 13 años (Parker, 1977) y puede ser usado en la adolescencia cuando se requiera. Sin embargo, no se recomienda para uso continuo como fórmula infantil, aunque en algunos casos ha sido usado con resultados satisfactorios (Anónimo, 1986). En la Tabla 2.5, se da un análisis proximal de este producto.

Tabla 2.5 Análisis proximal de PHENYL-FREE (Anónimo, 1986)

Componente	g/100 g de polvo
Equivalente de proteína (N x 6.25)	20.3
Grasa	6.8
Carbohidratos	66.0
Minerales (cenizas)	3.8
Humedad	3.2

Los productos MILUPA PKU-1 y PKU-2, son mezclas sintéticas de L-aminoácidos que contienen vitaminas, minerales, elementos traza y cantidades mínimas de sacarosa. Los dos productos son totalmente libres de fenilalanina. Sin embargo, son productos incompletos. Cada uno debe ser suplementado por cantidades controladas de carbohidratos, grasas y una cantidad cuidadosamente medida de fenilalanina (p.ej., a partir de leche materna, fórmula infantil o bien frutas y verduras).

Tienen la ventaja de estar formulados para semejar el patrón de aminoácidos de la leche materna (Figura 2.3) y por la composición de la fórmula, el sabor es mucho mejor que el de los productos basados en hidrolizados de proteínas. Debido a estas características, el tratamiento con estos alimentos permite una mayor variedad en la dieta y se evita el exceso de peso cuando se tienen que suministrar dosis altas (Anónimo, 1986). En las Tablas 2.6 y 2.7 se dan las composiciones de ambos productos.

Sin embargo, Altshul (1974) hace notar que una mezcla sintética de aminoácidos es un alimento no natural que no siempre es aceptado por tener un sabor fuerte y en algunos casos de mal olor. Además, estas mezclas deben cumplir con ciertos requisitos en cuanto a la cantidad de metionina y cisteína, que no debe exceder a 1 mmol/Kg por día, así como que el exceso de cationes (Na⁺ y K⁺), no deberá exceder el contenido de Cl⁻, ya que si ésto no se cumple se puede llegar a una condición de acidosis metabólica. Se ha observado que algunos niños alimentados con

Tabla 2.6 Composición del alimento MILUPA PKU-1
(Anónimo,1980).

Nutrimiento	g/100 g de producto
Proteína	50.3
Aminoácidos	60.3
L-His	1.4
L-Ile	3.4
L-Leu	5.7
L-Lis	4.0
L-Met	1.4
L-Tre	2.7
L-Trp	1.0
L-Val	4.0
L-Ala	2.4
L-Arg	2.0
L-Asp	5.7
L-Cis	1.4
L-Glu	12.0
L-Gli	1.4
L-Pro	5.4
L-Ser	3.0
L-Tir	3.4
Sacarosa	17.6
Contenido de humedad	5.2
Energía (Kcal)	272
Vitaminas	1.29
Minerales	9.84

Tabla 2.7 Composición del alimento MILUPA PKU-2
(Anónimo,1980).

Nutrimiento	g/100 g de producto
Proteína	66.7
Aminoácidos	80.1
Sacarosa	7.1
Contenido de humedad	3.5
Energía (Kcal)	295
Vitaminas	0.70
Minerales	5.46

mezclas de aminoácidos, tienden a la anorexia y al vómito (Bickel 1980, Manz 1977).

2.2.3 Otros enfoques

Aunque el control de la fenilalanina por medio de la dieta es la principal forma de tratamiento, en la práctica otras técnicas han sido examinadas. La fijación o atrapamiento de PH y DHFR en una matriz de poliacrilamida, ofrece el potencial de una terapia de reemplazo de enzimas estabilizadas, pero los intentos para hacer funcionar esta técnica han sido improductivos. La exposición *in vivo* a fenilalanina amonía liasa, para reducir la fenilalanina en estados de hiperfenilalaninemia, han sido examinados como una alternativa a la terapia dietética sin mucho éxito práctico. La inhibición del transporte de fenilalanina a través de las membranas celulares ha sido una antigua idea que ha atraído mucho la atención, sin embargo, deberá esperar algún tiempo antes de ser aplicada *in vivo* (Scriver, 1980b).

2.3 Fenilalanina

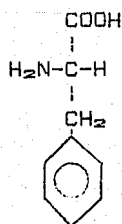
2.3.1 Propiedades

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

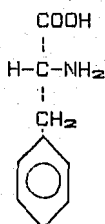
Los aminoácidos (entre ellos la fenilalanina), son compuestos anfotéricos por la presencia de los grupos amino y carboxílico. La forma iónica depende del pH. A pH ácido se tiene la forma $+NH_3CH(R)COOH$, a pH alcalino se tiene $NH_2CH(R)COO^-$ y en su punto isoelectrónico se tiene como zwitterion, de la forma $+NH_3CH(R)COO^-$.

Estructuralmente todos los aminoácidos son comparables, difiriendo únicamente en el grupo lateral R. La estructura de la fenilalanina se muestra en la Figura 2.4. Cabe mencionar que el grupo lateral de la fenilalanina (grupo fenilo), le confiere características de aminoácido no polar (a pH de 7), por lo que su localización en la estructura de las proteínas globulares es preferencialmente interna (Lenhinger, 1986). Algunas de sus principales características se presentan en la Tabla 2.8.

Los aminoácidos son en alguna medida solubles en agua pero son prácticamente insolubles en alcohol y otros solventes orgánicos. Son cristales sin color, estables a temperatura ambiente y poseen altos puntos de fusión y descomposición (Lenhinger 1986, Greenstein 1961). Las series L y D 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).



L-fenilalanina



D-fenilalanina

Figura 2.4 Estructura de la fenilalanina. Por poseer un carbono asimétrico, se presenta en dos formas ópticamente activas, L y D.

Tabla 2.8 Características de la fenilalanina.

Nombre químico	ácido 2-amino-3-fenilpropiónico ácido α -amino- β -fenilpropiónico
Nombre trivial	ácido α -aminohidrocinámico
Fórmula empírica	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$: C 65.44%, H 6.71%, O 19.37%, N 8.48%
Peso molecular	165.20
Rotación específica $[\alpha]_D^{25}$	$= -34.5$ (forma L aislada de proteína)
Punto isoelectrico	5.53
pKa1 (25°C)	1.83
pKa2 (25°C)	9.24
Máxima absorción UV	a 260 nm
Solubilidad en agua	29.6 g/l (25°C)
Punto de fusión	283°C (Descomposición)

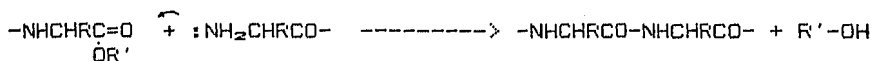
2.3.2 Reacciones

La mayor parte de las reacciones se deben a los grupos amino o carboxilo. Algunas de sus reacciones se presentan a continuación.

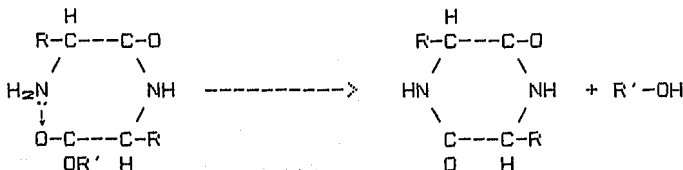
- Formación de α -aminoester



Estos compuestos no son estables y pueden polimerizar en la forma:



cuando son almacenados o bien por calentamiento. Cuando están en solución en algún solvente se puede formar una amida cíclica por condensación de moléculas de aminoester.



ANHIDRIDO DE AMINDACIDO

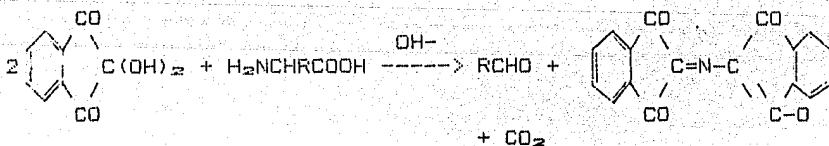
Este tipo de moléculas puede formarse sin mucha dificultad cuando esta implicado un dipéptido.

- Formación de complejos metálicos.

Este tipo de reacción permitió la identificación de la fenilalanina por Schulze, al formar un complejo con acetato de cobre ($[C_9H_{14}NO_2]_2Cu$). De hecho se ha propuesto como una técnica de separación de fenilalanina producida por fermentación (Evans, 1987).

- Transaminación

Las aminas primarias condensan con compuestos carbonilo, especialmente con aldehidos aromáticos, para formar iminas. Cuando un aldehido aromático se involucra, el producto es:



2.3.3 Bioquímica

Bioquímicamente la fenilalanina forma parte de la ruta de formación de acetatoacetyl-CoA y ácido fumárico que son usados en el ciclo del ácido cítrico. La fenilalanina se considera aminoácido cetogénico (que forma compuestos cetónicos) y glucogénico (que pueden formar glucosa y glucogeno).

La fenilalanina (vía la tirosina) es precursora de la hormona tiroidea, tiroxina y de las hormonas adrenalina y noradrenalina, secretadas por la médula adrenal (Lenhinger, 1986).

2.3.4 Fenilalanina en los alimentos

La fenilalanina representa aproximadamente un 5% del total de residuos que componen la proteína de los alimentos, con ligeras variaciones dependiendo del origen, pero siempre en la forma óptica L.

La fenilalanina es un aminoácido muy estable en los alimentos. Es estable cuando se expone el alimento a oxígeno o aire, luz o calor y también a las condiciones generalmente usadas en el cocinado, ya que la pérdida de este aminoácido se ha encontrado que es tan sólo de 0 a 5%. Sin embargo, la fenilalanina es parcialmente destruida por la luz ultravioleta, por tratamiento con calor seco o por radiaciones. Es estable a cambios de pH, a menos que el tratamiento del alimento sea fuertemente alcalino, ya que como otros aminoácidos, se racemiza. En mezclas de proteínas y carbohidratos, como ocurre en los alimentos, los aminoácidos libres reaccionan con los grupos aldehído de los azúcares, resultando en la destrucción de los mismos (reacción de Millard). Los oxidantes fuertes (p.ej., H₂O₂) también afectan a la fenilalanina (Harris, 1977).

Para los organismos superiores, p.ej., el hombre, la fenilalanina es uno de los aminoácidos esenciales, ya que no puede ser sintetizado por el organismo y debe ser suplementado en la dieta. La tirosina es derivada de la fenilalanina y por lo tanto no es esencial siempre y cuando el consumo de fenilalanina sea adecuado; pero si la conversión de fenilalanina a tirosina es inhibida como en la fenilcetonuria, la tirosina pudiera llegar a ser un aminoácido esencial (Dalglish, 1956).

En la Tabla 2.9, se dan los requerimientos diarios de fenilalanina y tirosina para humanos sanos. Hay que recordar que los estudios nutricionales consideran a la fenilalanina y

tirosina en forma conjunta, como el requerimiento de aminoácidos aromáticos (Fennema, 1986).

Tabla 2.9 Requerimiento de aminoácidos aromáticos (Fen+Tir).

	mg/día por kg	Patrón ideal mg/g de proteína
Bebés (0 a 6 meses)	125	63
Niños	27	34
Adultos	14	25

2.4 La leche y sus componentes

La Federación Internacional de la Leche establece la siguiente definición: " La leche es el producto de la secreción de las glándulas mamarias normales, obtenida por sustracción o presión" (Lugat, 1985).

La leche de vaca es un líquido blanco mate opaco, que puede tener un color amarillento que es función del contenido de B-carotenos en la materia grasa. Tiene un olor característico y un sabor agradable y dulce (dependiendo de la especie animal de que provenga).

El conocimiento de las propiedades químicas, físicas y biológicas de la leche es básico para entender los procesos en los cuales ésta es la materia prima principal. Estas propiedades serán las que darán, en última instancia, las características del producto final.

La leche está compuesta de grasa, proteínas, carbohidratos, cenizas y agua. Químicamente la leche es un material complejo, constituido de varios cientos de compuestos diferentes, muchos de los cuales, se presentan en baja concentración, sin que por ésto dejen de tener alguna función en el conjunto (Figura 2.5).

En la leche los componentes se encuentran presentes en diferentes fases, de las cuales se reconocen tres:

- 1) solución verdadera (lactosa, sales),
- 2) suspensión coloidal (caseína y proteínas del suero), y
- 3) emulsión (el sistema de lípidos de la leche).

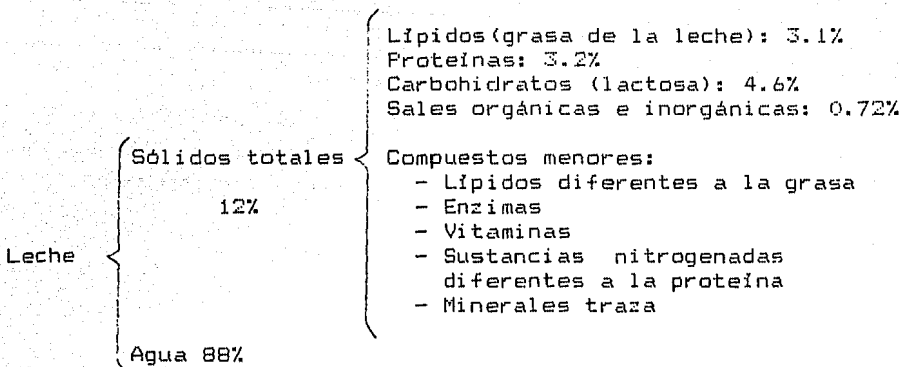


Figura 2.5 Composición de la leche fluida.

Las proteínas de la leche se pueden dividir en dos grupos: caseína y proteínas del suero. Estas por lo general están constituidas por cadenas de más de 150 aminoácidos.

La caseína es un término genérico para designar una clase de proteínas que son sintetizadas en las glándulas mamarias, las cuales representan alrededor del 85% del total de proteínas en la leche.

La caseína está constituida por cinco tipos de proteína (Tabla 2.10):

- a) caseína alfa-s1,
- b) caseína alfa-s2,
- c) caseína beta,
- d) caseína kapa, y
- e) caseína gama.

Químicamente el sistema caseína está definido como una glicofosfo-proteína, ya que contiene como parte integral de su estructura, carbohidratos (grupo glicol) y fósforo.

En la leche, la caseína existe como sal de calcio, llamada caseinato de calcio, en forma de partículas globulares de 30 a 40 μ m de diámetro, llamadas micelios. Cada micelio, está constituido por los diferentes componentes de la caseína, los cuales se mantienen unidos por el fosfato de calcio.

La caseína comercial se obtiene a partir de leche descremada, precipitando la caseína por adición de algún ácido, por fermentación láctica o bien por adición de extracto de renina. El pH de precipitación se da alrededor de 4.7. Los ácidos usados para la precipitación son acético, láctico, clorhídrico o sulfúrico.

Tabla 2.10 Composición en aminoácidos de las caseínas de la leche y de la caseína en su conjunto.

A.A.	Número de residuos (Lugat, 1985)				Caseína (FAO, 1970) (g/100 de proteína)
	-S1	B	k	-S2	
Asp	7	4	4	4	7.13
Asn	8	5	7	14	-
Tre	5	9	14	15	4.66
Ser	16	16	17	17	6.03
Glu	25	17	12	15	22.09
Gln	14	22	14	15	-
Pro	17	35	20	10	11.58
Gli	9	5	2	2	1.97
Ala	9	5	15	8	3.07
Val	11	19	11	19	6.74
Met	5	6	2	4	2.74
Ile	11	10	13	11	5.41
Leu	17	22	8	12	9.51
Tir	10	4	9	6	5.82
Fen	8	9	4	24	5.24
Lis	14	11	3	3	8.12
His	5	5	1	2	2.92
Trp	2	1	5	6	1.61
Arg	6	4	1	0	3.75
1/2 Cis	-	-	2	2	0.36
Total	199	209	169	207	-

La caseína precipitada puede ser recuperada y resuspendida en agua para su uso o bien secada. Alternativamente, por adición de hidróxido de sodio se puede formar caseinato de sodio que es una de las presentaciones comunes como se comercializa. El caseinato de sodio tiene la característica de ser más fácil de disolver en agua que la sal de calcio (Harper y Hall, 1981).

2.5 Procesamiento de productos lácteos

Los productos lácteos son tradicionalmente clasificados en dos grandes grupos, productos de leche fluida y productos elaborados de leche. Las instalaciones industriales destinadas a su procesamiento están diseñadas en general para manejar ambos grupos de alimentos o bien para algún producto elaborado en particular, siendo los procesos y equipos similares en todos los casos.

Los productos elaborados de leche incluyen a los helados, leches evaporadas o concentradas, fermentadas, en polvo, quesos y mantequilla

En el caso de fórmulas infantiles, los productos generalmente se formulan con leche en polvo descremada, aceite vegetal, hidrocolóides, algún carbohidrato y los nutrientes necesarios para que resulte un alimento completo. Estos productos generalmente son distribuidos como fórmulas en polvo listas para usarse.

En el procesamiento de todo producto lácteo se involucran operaciones de transporte de fluido a diferentes velocidades de corte, operaciones de transferencia de calor tanto para calentar como para enfriar y empaclado o envasado.

Adicionalmente, ciertos productos requieren de la aplicación de alguno de los siguientes procesos u operaciones:

- a) fuerza centrífuga
- b) coagulación
- c) fermentación
- d) tratamientos a vacío
- e) inversión de fase
- f) congelado
- g) secado
- h) adición de algún nutrimento
- i) utilización de algún aditivo alimenticio, tal como acidulantes, hidrocolóides o algún emulsificante.

El entendimiento de cada una de las operaciones del proceso global, es esencial para cumplir con los requisitos necesarios para tener una aceptación total por parte del consumidor.

Aunado a lo anterior, es necesario comprender y controlar los cambios en la estructura de los componentes que se dan en cada

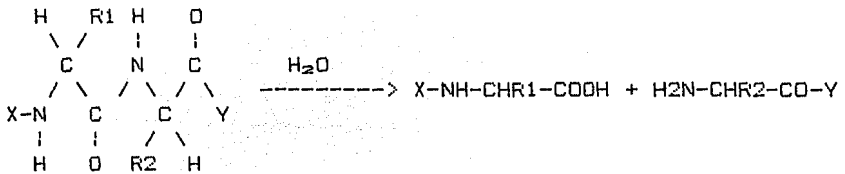
etapa del proceso debido a la actividad microbiana y a las condiciones fisicoquímicas del proceso.

Tales cambios que pueden incidir significativamente en la salud de los consumidores y/o calidad del producto final, son dependientes de muchas variables y frecuentemente son debidos a la interacción de diversos factores.

En vista de la anterior, el diseño de un proceso para algún producto en particular estará en función de las propiedades de la materia prima y las características nutricionales, de calidad y funcionalidad que sea necesario cubrir para lograr la aceptación por parte del consumidor final (Harper y Hall, 1981).

2.6 Hidrólisis de proteína

La hidrólisis de proteína es la reacción en la cual se rompen los enlaces peptídicos que unen a los constituyentes de las proteína, para formar péptidos y aminoácidos (si la hidrólisis es parcial) o bien sólo aminoácidos (si la hidrólisis es completa). La reacción de hidrólisis del enlace peptídico, puede expresarse en la forma:



La hidrólisis de proteína se realiza en tecnología de alimentos con varios fines:

- Ablandamiento de carnes.
- Producción de queso (hidrólisis de caseína con renina o algun sustituto.
- Clarificación en frio de cerveza.
- Modificar las propiedades funcionales de la proteína en los productos de los cuales es parte constitutiva, para el mejoramiento o creación de nuevos productos (Richardson, 1977).
- Para la utilización de desperdicios ricos en proteína o bien de proteína no convencional, p.ej., proteína vegetal (Fox, 1980).
- Formación de sabores especificos o potenciadores de sabor, p.ej., hidrolizados de soya (Eriksen, 1976).

- Se han propuesto a los hidrolizados de proteína como una solución en el tratamiento de problemas digestivos relacionados con las proteínas, p.ej., fibrosis cística y alergias a las proteínas de la leche (Cogan,1981), así como, en el tratamiento de bebés prematuros, pacientes en periodos pre y postoperatorios y pacientes en unidades de cuidados intensivos.

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

- 1) Hidrólisis ácida.
- 2) Hidrólisis alcalina.
- 3) Hidrólisis por catálisis con metales, e
- 4) Hidrólisis enzimática.

2.6.1 Hidrólisis ácida

La hidrólisis ácida parcial de una proteína involucra el rompimiento en forma paralela y en forma consecutiva de una gran variedad de enlaces, que resulta en una mezcla de productos tan compleja que los estudios cinéticos del proceso involucran problemas experimentales insalvables.

Los parámetros que gobiernan la reacción son: temperatura, presión, concentración de ácido y presencia de material no proteico. Como ejemplo, la hidrólisis de insulina requiere de ácido clorhídrico 11-12 N, durante 3 o 4 días a 37°C, para formar dipéptidos, tripéptidos y algunos oligopéptidos (Hill,1965).

La hidrólisis ácida completa de proteína se puede lograr con: ácido clorhídrico 6N, durante 24 horas a 110°C. Sin embargo, la reacción llevada a cabo de esta forma, da como resultado la casi completa destrucción de glutamina, asparagina y triptófano. Adicionalmente, se ha observado la destrucción parcial de tirosina, serina, cisteína, ácido aspártico y glutámico, lisina, arginina, treonina y prólina, siendo el grado de destrucción función de las condiciones de hidrólisis y el tipo de proteína usada.

2.6.2 Hidrólisis alcalina

Los álcalis no han sido usados extensamente para la degradación de proteína y polipéptidos. Sus limitaciones han sido establecidas completamente y los estudios al respecto son pocos.

En la hidrólisis alcalina, varios aminoácidos son destruidos: la serina se descompone para dar glicina; la treonina forma glicina, alanina y ácido alfa-aminobutírico; la arginina resulta en ornitina, citrulina y amoniaco; la cisteína y cistina dan alanina, sulfuro de hidrogeno, amoniaco y ácido pirúvico. Y aquellos aminoácidos que son estables a la acción de las bases,

son racemizados en forma considerable. Debido a que los álcalis promueven este tipo de cambios, no han sido aplicados en la solución de problemas en hidrólisis de proteína. Se ha planteado igualmente la formación de dipéptidos tóxicos (lisino-alanina) en los tratamientos alcalinos de proteínas (Satterlee, 1981).

2.6.3 Hidrólisis de proteína por catálisis con metales

Son pocos los ejemplos conocidos del efecto de iones metálicos en la hidrólisis de uniones peptídicas. Lawrence y Moore (1951), encontraron que el cloruro de cobalto casi duplicaba la velocidad de hidrólisis ácida de glicilglicina. Meriwether y Westheiner (1956), examinaron el efecto de los iones de cobre, cobalto y níquel en la hidrólisis de glicilamina y fenilalanilglicilamina. Encontraron que el ion cobre, incrementaba la velocidad de reacción por un factor de 30. También hay ejemplos del uso de quelatos con fines catalíticos. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual los iones metálicos mejoran la velocidad de reacción.

2.6.4 Hidrólisis enzimática de proteína

Las enzimas son proteínas sintetizadas por las células, que catalizan reacciones termodinámicamente posibles.

Las enzimas que promueven la reacción de hidrólisis de proteínas son llamadas proteasas, siendo éstas el grupo de enzimas de mayor importancia en la industria de procesamiento de alimentos (Whitaker, 1972).

En el tracto digestivo del hombre la pepsina, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasas y aminopeptidasas, son las responsables de la hidrólisis de la proteína ingerida, para la liberación de aminoácidos.

Si nos referimos a la reacción de hidrólisis presentada anteriormente, los requerimientos de especificidad en términos de la naturaleza química de R1 y R2, representa una característica fundamental en la aplicación de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la alfa-quimotripsina hidroliza el enlace peptídico a una velocidad apreciable cuando R1 es la cadena lateral de tirosina, fenilalanina o triptófano; por otro lado, la carboxipeptidasa y la pepsina tienen especificidad directa sobre la naturaleza de la cadena lateral R2. Ambas enzimas hidrolizan la unión peptídica a una velocidad máxima si R2 es la cadena lateral de un residuo de fenilalanina.

Otros factores que se han observado que influyen la reacción de hidrólisis enzimática son:

- a) La configuración de los aminoácidos debe ser L.

b) El tamaño del compuesto para la mayoría de las enzimas no parece ser de importancia. Sin embargo, para enzimas ácidas (que funcionan a pH bajo), este factor es importante.

c) La naturaleza de X y Y.

El que las enzimas requieran que X y Y sean un hidrógeno y grupo carboxílico o que sea un derivatizado (respectivamente), nos permite distinguir entre las enzimas exopeptidasas y las endopeptidasas.

Las exopeptidasas cortan el extremo terminal de la cadena peptídica.

En el caso de las endopeptidasas, que pueden romper uniones peptídicas al azar en el interior de las proteínas (si el requerimiento de R1 y R2 es llenado), la máxima actividad se tiene cuando X y Y están derivatizadas. X puede ser un grupo acilo (acetil, benzoyl, benzocarbonil, etc.) y Y una amina o un grupo ester, o bien los grupos pueden ser aminoácidos.

De acuerdo al mecanismo de acción se les puede dividir en cuatro grupos:

- a) proteasas sericas,
- b) proteasas sulfhidrúlicas,
- c) proteasas que contienen metales, y
- c) proteasas ácidas.

Las proteasas sericas incluyen a la familia de las quimiotripsinas y tripsina. Todas tienen en común la característica de que son inhibidas por diisopropilfosforo fluorhidrato (DFP), que reacciona con el grupo hidroxilo de la serina en el sitio activo. Tienen un máximo de actividad a pH alcalino. Las enzimas de este grupo son todas endopeptídicas.

Las proteasas sulfhidrúlicas son inhibidas por agentes que reaccionan con el grupo sulfhidrilo de la cisteína. Se incluye en este grupo a la papaína, fisina y bromelina, que tienen un pH óptimo entre 6 y 7.5. Son estables a temperaturas entre 60 y 80 C.

Las enzimas que contienen metales requieren de la presencia de algún ion metálico para su funcionamiento. Todas las enzimas de este grupo son exopeptidasas. Son activas a pH neutro. En este grupo se incluyen a las carboxipeptidasas A y B.

Enzimas ácidas, son aquéllas que son activas a pH bajo. Ejemplos de este grupo son la renina y la pepsina, que tienen su óptimo de actividad a pH cercano a 2.

Las enzimas también pueden ser clasificadas de acuerdo a su origen : vegetales, animales y microbianas.

Los parámetros frecuentemente empleados para describir una hidrólisis enzimática son: concentración de sustrato (expresada en % en peso de la mezcla de reacción), relación enzima/sustrato

(expresada en % en peso), el pH y la temperatura de reacción (Adler-Nissen, 1986).

2.7 Adsorción. Consideraciones teóricas

Se reconoce a la adsorción como el proceso en el cual una molécula (o átomo) se une a una superficie sólida, lo que implica que la molécula (o átomo) se encuentra en el mismo lugar que el sitio activo de adsorción (Smith, 1968). La adsorción está basada en fuerzas de atracción intermoleculares, entre el soluto y la superficie sólida. En general, sólo ocurrirá adsorción en una monocapa y la superficie disponible de adsorción no será cubierta completamente (Vermeulen, 1958).

El sistema de adsorción consiste de una fase líquida o gaseosa, llamada adsorbato, en contraste con una fase sólida, llamada adsorbente. La porción de la fase líquida cercana al adsorbente, donde las moléculas de líquido interactúan con el sólido, es llamada la fase adsorbida. El resto de la fase líquida, consistente de moléculas alejadas de la superficie del sólido, de tal manera que las interacciones líquido-sólido son despreciables, es llamada fase fluida. El adsorbato y el adsorbente son, en principio, mutuamente insolubles (Sircar y Myers, 1971).

La superficie de los materiales sólidos (aun de los más pulidos), no es lisa a un nivel microscópico y se puede visualizar como formada de crestas y valles. Tales regiones son particularmente susceptibles a tener campos de fuerza residual. En estos puntos, los átomos de la superficie del sólido pueden atraer y adsorber a otros átomos y moléculas de algún gas o líquido que los rodee. Se distinguen dos tipos de adsorción, la física y la quimisorción.

La adsorción física es un proceso poco selectivo y parecido a un proceso de condensación. Las fuerzas que atraen a los átomos y moléculas del fluido hacia la superficie del sólido, son relativamente débiles y el calor liberado durante los procesos de adsorción exotérmicos, son del mismo orden de magnitud que el calor de condensación. El equilibrio entre la superficie sólida y las moléculas adsorbidas es rápidamente alcanzado y fácilmente reversible, ya que los requerimientos energéticos son bajos. Como tal, el proceso de adsorción física es una función decreciente de la temperatura y no depende de la naturaleza irregular de la superficie; sin embargo, es generalmente proporcional a la cantidad de superficie disponible.

El segundo tipo de adsorción (la quimisorción) es un proceso específico e involucra fuerzas de atracción y unión mayores que en la adsorción física, en este tipo de adsorción, el equilibrio solo se alcanza a temperaturas muy elevadas, a las cuales la desorción resulta un proceso importante (Smith, 1981).

En el caso ideal de separación por adsorción, de una sustancia en una mezcla, el adsorbente se combina fuertemente sólo con la sustancia a ser separada y muestra poca o ninguna

afinidad por los otros componentes. Estos casos pueden algunas veces, llevarse a cabo eligiendo adecuadamente el adsorbente y el solvente en el caso de sustancias solubles en solventes orgánicos. Sin embargo, en la gran mayoría de los casos las diferencias en afinidad de adsorción no son suficientemente grandes para permitir una separación del tipo "todo o nada" (Tiselius, 1947).

La separación de mezclas binarias o multicomponentes por adsorción es algunas veces ventajosa debido a que los costos de capital y operación en muchas circunstancias son comparativamente bajos con respecto a otras operaciones. Sin embargo, el diseño de tales equipos ha sido realizado principalmente con la asimilación de datos empíricos, por lo que se requieren mediciones y observaciones de planta piloto, antes de proceder al diseño de la operación a escala final. Esto no es sorprendente ya que el diseño basado en modelos matemáticos, aun de procesos binarios, está lleno de dificultades (Thomas y Lombardi, 1971).

Sin embargo, en años recientes el trabajo teórico y experimental se ha dirigido a la descripción de los efectos de transferencia de masa inter e intrapartícula, los cuales son concomitantes con el proceso de adsorción en lechos operados isotérmicamente. En esta forma ha sido posible para algunos sistemas, preparar diseños a escala comercial a partir de datos de laboratorio, siempre y cuando se haya involucrado el principio de similitud geométrica y suponiendo que el equipo de laboratorio pueda ser considerado como un modelo del equipo final (Thomas y Qureshi, 1971).

La adsorción como una operación unitaria se ha desarrollado en los últimos años, por lo que la tecnología publicada al respecto, ofrece poca ayuda a una persona que se enfrenta a un problema práctico de diseño de una unidad comercial. Sin embargo, se reconoce que son necesarios tres tipos de información para llevar a cabo la tarea de diseñar una unidad con regeneración del adsorbente:

- 1) Capacidad de equilibrio: ¿qué tanto de un adsorbato será adsorbido, bajo un conjunto de condiciones dadas?
- 2) Velocidad de adsorción: ¿qué tan rápido será adsorbido el adsorbato bajo esas condiciones?
- 3) Vida útil: ¿cuántas veces se puede repetir la operación?

2.7.1 Equilibrio de adsorción

La mayoría de los datos publicados corresponden a datos de equilibrio. Estos datos están basados en una gama de definiciones, tanto teóricas como empíricas, tanto para la caracterización de sistemas de componentes puros, como multicomponentes. Sin embargo, ninguna describe la mayoría de las observaciones en una base teórica rigurosa.

Algunos de los modelos más comúnmente encontrados para componentes puros, son (Dudar, 1975):

-Langmuir: la naturaleza de la energía de adsorción es similar a una combinación química.

$$\frac{V}{V_m} = \theta = \frac{bP}{1 + bP}$$

-Freundlich: toma en cuenta la distribución de energía para sitios de adsorción heterogéneos.

$$V = kP^{1/n} \quad (n > 1)$$

-B.E.T.: las fuerzas de unión son del tipo condensación.

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \left(\frac{P}{P_0} \right)$$

-Polanyi: la adsorción es un proceso físico, de naturaleza eléctrica (Adamson, 1976a).

$$W = \sum \int_0^{\infty} (f_x - f_g) dx$$

donde: V = volumen de gas adsorbido
 V_m = máximo volumen de adsorción
 P = presión
 P₀ = presión de vapor del gas
 W = trabajo
 f_x = densidad del adsorbato a una distancia x del adsorbente
 f_g = densidad del gas
 b, C, k, n = constantes

En el caso de mezclas multicomponentes, los modelos propuestos son una extensión de alguno de los cuatro modelos anteriores (Anderson, 1977).

Un buen número de relaciones expresan la concentración de equilibrio en moles de sustancia adsorbida por unidad de fase sólida (q), como una función de la concentración del adsorbato en moles por unidad de volumen de fase líquida (c). La curva que representa esta función corresponde a condiciones de temperatura constante, por lo que es conocida como isoterma de adsorción. Se reconocen tres clases importantes de isotermas. La primera de ellas, identificada como de equilibrio "favorable", es convexa

hacia arriba. La segunda es de equilibrio "desfavorable", con la curva cóncava hacia arriba. Por último, existe un caso intermedio entre los dos casos anteriores, la isoterma lineal (ver Figura 2.6).

Como se puede observar en la figura 2.6, la pendiente de un sistema favorable es una función decreciente, mientras que la de una isoterma desfavorable es una función creciente (Vermeulen, 1958).

2.7.2 Efectos térmicos

Todos los procesos de adsorción generan calor. Sin embargo, los gradientes de temperatura son generalmente menores para sistemas líquido-sólido (por ejemplo, adsorción de una solución acuosa), que para sistemas gas-sólido, ya que la capacidad calorífica de un líquido es de un orden de magnitud mayor que para gases, por lo que en muchas ocasiones, se puede suponer como un proceso esencialmente isotérmico (Smith, 1968).

2.7.3 Velocidad de adsorción. Transferencia de masa

No hay un solo enfoque que sea completamente versátil y satisfactorio para la descripción del proceso de adsorción. Se han usado técnicas de altura o número de unidades de transferencia para la descripción de sistemas empacado, sin embargo, se requiere de muchos datos aun para sistemas simples. Más aún, los datos en la literatura son raramente confiables.

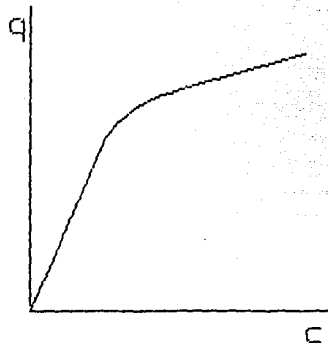
La velocidad efectiva de adsorción (o desorción) en sistemas líquido-sólido, esta gobernada por uno o mas pasos difusionales. La transferencia de masa puede ser clasificada en dos regímenes: 1) la fase fluida y 2) la fase sólida. El transporte de masa del adsorbato entre la fase fluida y la superficie del adsorbente, está gobernada por difusibilidad molecular o ionica y también por difusibilidad eddy en flujo turbulento. La última de ellas, controla el espesor efectivo de la capa en la interfase líquido-sólido.

La transferencia de masa del gas o líquido hacia la fase sólida, en los adsorbentes amorfos (p.ej., el carbón activado), es invariablemente controlada por difusibilidad molecular a través de los macroporos del sólido, esto es, de la parte exterior del sólido a los sitios de adsorción internos (Anderson, 1977).

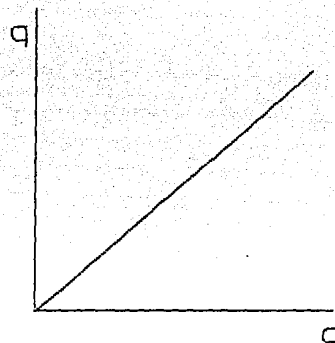
Lo que es importante es una distinción entre el paso de adsorción en un sitio específico y los procesos por los cuales el adsorbato es transferido a tal sitio.

En sistemas acuosos, así como en otros sistemas, algunos de los pasos en los procesos de transferencia tienen coeficientes de velocidad relativamente altos. Tales pasos pueden ser tratados como que ocurren en la cercanía del equilibrio, por lo que las fuerzas directoras, tanto de gradientes de temperatura como de concentración, se acercan a cero.

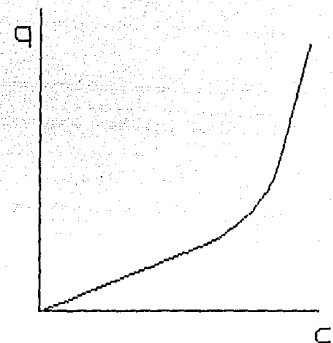
$\frac{\text{moles de adsorbato}}{\text{unidad de fase sólida}}$



Equilibrio Favorable



Caso Intermedio



Equilibrio Desfavorable

$\left(\frac{\text{moles de adsorbato}}{\text{unidad de volumen}} \right)$

Figura 2.1 Isotermas de adsorción representativas.

Un método común de considerar la importancia relativa de las resistencias difusionales internas y la adsorción puntual, es medir, como una función del tiempo, la cantidad de adsorbato ligada a partir de una solución con el adsorbente. Los datos obtenidos de pruebas por lote, tomadas a diferentes temperaturas y tamaños de partícula, pueden ser analizados de tal manera que se establezca la importancia de las resistencias internas. Sin embargo, algunos tipos de difusión tienen energías de activación relativamente altas, por lo que la separación es compleja. También en tales pruebas, se debe tener cuidado de asegurar un movimiento rápido del fluido con respecto a las partículas, por ejemplo con agitación, con el fin de eliminar las resistencias difusionales externas (Smith, 1968).

2.7.4 Adsorción de mezclas multicomponentes

En estudios que involucran soluciones de materiales de interés biológico, los sistemas con que se trata típicamente están caracterizados por ciertos atributos comunes. Usualmente son sistemas acuosos que contienen uno o más componentes polieléctricos o polianfólitos, que pueden ser considerados, para propósitos prácticos como que no se difunden. Frecuentemente contienen también compuestos de bajo peso molecular y por tanto que se difunden, incluyendo al menos uno que está ionizado. En el presente contexto, los aspectos más importantes a considerar en estas soluciones, es que son sistemas multicomponentes y que contienen especies que se difunden y otras que no lo hacen (Casassa y Eisenberg, 1965).

El problema de la descripción de la adsorción a partir de una solución multicomponente ha sido investigado muy poco, tanto teórica como experimentalmente. Los estudios al respecto, toman en cuenta algunos factores que ejercen influencia significativa en el equilibrio de adsorción, como son: la heterogeneidad energética del sólido, la no idealidad de la solución, la formación de multicapas y la interacción entre los componentes de la solución. Sin embargo, a la fecha tales estudios no son concluyentes (Darilo-Marczewska y colaboradores, 1985).

2.7.5 Adsorción con carbón activado

Tiselius (1947), en su revisión sobre el uso del carbón activado para estudios de separación de mezclas de aminoácidos cita que es una técnica usada desde 1919. Experimentalmente realizó mediciones del volumen de retención, como un medio para comparar la adsorción de diferentes aminoácidos en carbón activado (Tabla 2.11). Encontró que el uso de diferentes tipos de carbón muestran diferencias más o menos grandes, pero concluye que el orden que se muestra en la Tabla 2.11 no cambia con el tipo de carbón.

Tales diferencias, menciona, permiten visualizar la posibilidad, al menos teóricamente, de separar aminoácidos y péptidos por medio de adsorción con carbón activado.

Tabla 2.11 Volumen de retención en la adsorción de algunos aminoácidos y péptidos en carbón activado (Carbo Activ Schering). Soluciones acuosas al 0.5%

Sustancia	Volumen de retención ml/g de carbón
Alanina	0.3
Hidroxiprolina	2.0
Prólina	2.5
Valina	3.2
Leucina	7.7
Isoleucina	9.2
Metionina	12.4
Histidina	15.0
Arginina	40.4
Triptófano	76.5
Fenilalanina	62.5
Glicil-glicina	3.5
Leucil-glicina	18.2
Leucil-glicil-glicina	29.8
Glicil-alanina	4.0
Valil-alanina	22.0
Alanil-leucil-glicina	34.4

De la Tabla 2.11, se observa que el triptófano y la fenilalanina son fuertemente adsorbidos (también lo sería la tirosina). De hecho se ha probado que se pueden lavar todos los aminoácidos en una columna de carbón activado, reteniendo únicamente los aminoácidos aromáticos; con lo que serviría como un primer paso en la separación de aminoácidos de un hidrolizado proteico. Sin embargo, si la hidrólisis es incompleta la elución de los péptidos alifáticos (con dos o tres aminoácidos), pudiera no ser cuantitativa, ya que algunos péptidos se unen tan fuerte como los aminoácidos aromáticos.

De los estudios realizados por Tiselius y otros investigadores (Tiselius, 1941; Schramm y Primosigh, 1943), se ha observado que durante el proceso de adsorción pudiera ocurrir desaminación u oxidación de los aminoácidos. Tal situación se puede prevenir "envenenando" el carbón con KCN y/o realizando las experiencias durante tiempos cortos.

El procedimiento recomendado por Tiselius, incluye un pretratamiento con ácido acético al 5%, ya que sin él, parte de los aminoácidos permanecen adsorbidos fuertemente.

En el laboratorio, los procedimientos experimentales tienen tres objetivos:

1) Determinar si un carbón activado efectivamente realiza la separación deseada.

2) Seleccionar el carbón más adecuado.

3) Establecer las condiciones óptimas de adsorción.

Algunos aspectos que hay que tener en cuenta en el caso del carbón activado como adsorbente, se pueden resumir de la siguiente forma (ver también las Tablas 2.12 y 2.13) (Hassler, 1974):

a) El método para decidir cual es el mejor carbón activado, es por "prueba y error".

b) El carbón granular requiere de mayor tiempo para alcanzar el equilibrio comparado con el finamente dividido. Independientemente de como se vaya a utilizar, las pruebas se deben hacer con carbón pulverizado.

c) Rara vez el carbón activado es adecuado para adsorción en medios alcalinos. En condiciones ácidas, se promueve la adsorción de ácidos orgánicos. El pH óptimo es específico para cada soluto.

Tabla 2.12 Factores que influyen en la adsorción en la interfase líquido-carbón activado (Hassler, 1974).

Atracción del soluto por el carbón
Atracción del solvente por el carbón
Poder de solubilización del solvente sobre el soluto
Asociación de especies
Ionización de las especies
Efecto del solvente en la orientación del soluto en la interfase
Competencia por la interfase en presencia de solutos múltiples
Interacción de solutos en soluciones multicomponentes
Coadsorción
Tamaño molecular de especies en el sistema
Distribución del tamaño de poro en el carbón
Área superficial
Concentración de constituyentes

Tabla 2.13 Influencia de la estructura molecular en la adsorción con carbón activado (Hassler, 1974).

- a) Los compuestos aromáticos son en general más adsorbibles que los alifáticos de tamaño molecular similar.
 - b) Las cadenas ramificadas son en general más adsorbibles que las cadenas lineales.
 - c) La influencia de grupos sustituyentes es modificada por la posición que ocupan, por ejemplo, orto, meta y para.
 - d) Los estereoisómeros muestran patrones inconsistentes.
 - e) Los isómeros ópticos, dextro y levo, parece que son igualmente adsorbidos.
-

Capitulo III Materiales y Métodos

Como se mencionó en la introducción, la finalidad del presente proyecto es el desarrollar un proceso para obtener un producto para ser suministrado a niños que padecen fenilcetonuria. Por las características del proyecto se decidió realizarlo en dos partes.

En la primera parte se determinaron las condiciones óptimas que permiten liberar la mayor proporción de fenilalanina en forma de aminoácido libre, a partir de una proteína de buen valor nutricional, alta disponibilidad y bajo costo, por medio de una hidrólisis enzimática. Esta etapa del proyecto fue llevada a cabo por Lara (1988).

La segunda parte del proyecto, objeto de esta tesis consiste de la determinación de las condiciones de separación de fenilalanina a partir del hidrolizado proteico, realización de pruebas piloto y evaluación económica del proyecto.

3.1 Plan de trabajo

En resumen, esta etapa del proyecto se desarrolló de la siguiente manera:

a) Estudio de alternativas que permitiesen separar la fenilalanina del hidrolizado de proteína.

b) Establecer la metodología para tratar el hidrolizado enzimático con el método de separación seleccionado.

c) Obtención de las condiciones necesarias para establecer un proceso que permita operar a nivel planta piloto.

d) Formulación del producto.

e) Pruebas a nivel planta piloto.

f) Evaluación económica preliminar.

3.1.1 Características del producto buscado

La base para desarrollar un alimento apto para niños, 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 tomamos 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 Secretaria 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 con (Diario Oficial,1988; ver también Codex Alimentarius,1981):

"IV. Proteínas: como mínimo 1.8g/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 grs. por 100 kilocalorías utilizables. La calidad de las proteínas deberá determinarse empleando el método del FER.

Podrán añadirse aminoácidos aislados a fin de mejorar el valor nutritivo de la fórmula, para mejorar la calidad de las proteínas, podrán añadirse aminoácidos esenciales únicamente en las cantidades estrictamente necesarias, los cuales deberán ser en su forma natural 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 esenciales para cumplir con los requerimientos diarios que permitan un sano desarrollo del individuo (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Requerimientos de aminoácidos esenciales en el humano (FAO,1973).

Aminoácido	Requerimientos en bebés (0-6 meses) mg/día por kg	Patrón ideal provisional para bebés mg/g de proteína
His	28	14
Ile	70	35
Leu	161	80
Lis	103	52
Met(+Cis)	58	29
Fen(+Tir)	125	63
Tre	87	44
Trp	17	8.5
Val	93	47
Total de a.a. esenciales	742	372.5
Requerimiento total de proteína (huevo o proteína de leche)	2000	

Por lo tanto, el producto que se pretende desarrollar deberá cumplir con los criterios anteriores en cuanto al contenido de proteína y aminoácidos, para que en principio llene con las disposiciones oficiales respectivas.

Por último, la dieta recomendada para niños fenilcetonúricos establece que la ingesta de fenilalanina deberá ser de 20 a 60 mg/día por kilogramo 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 menor a 20 mg, el crecimiento se detiene y si sube por encima de 100 mg sufre retraso mental (Davidson, 1979). Para el presente proyecto se determinó que el alimento no debería de proporcionar al paciente más de 40 mg/día por kilogramo de peso del niño.

3.2 Materiales

3.2.1 Reactivos

Los reactivos usados fueron grado analítico o espectroscopia en el caso de pruebas de laboratorio y grado alimenticio en el caso de pruebas a nivel planta piloto. Las enzimas fueron donadas por Enzimas y Productos Químicos S.A. de C.V. y ENMEX S.A. de C.V. o adquiridas de SIGMA Chem. Co. Las resinas de adsorción física fueron donadas por Rohm and Hass de México S.A. El carbón activado donado y adquirido de Clarificantes Mexicanos S.A. de C.V. La leche descremada donada por LICONSA. El caseinato de sodio donado y adquirido de ARANCIA S.A. de C.V. y Complementos Alimenticios S.A. Carbohidratos y grasa butírica donada por Arancia S.A. de C.V. Mezcla de vitaminas donada por Laboratorios Roche. Una lista de los principales reactivos y materias primas y su fuente se presenta en la Tabla 3.2.

3.2.2 Equipos e instrumentos

Los principales instrumentos utilizados en esta tesis se presentan en la Tabla 3.3. En la Tabla 3.4 se enlistan los equipos utilizados en laboratorio y planta piloto. Adicionalmente se utilizaron material y equipo común de laboratorio.

3.3 Metodología

A continuación se presentan los métodos experimentales utilizados para el desarrollo del presente trabajo. Para una descripción de la finalidad y resultados obtenidos de cada método referirse al capítulo 4.

La descripción de las metodologías se hace en dos partes. La primera incluye los métodos usados que son descritos en la literatura. La segunda parte lo constituyen aquellos métodos que se utilizaron durante el desarrollo de la tesis y que fueron adaptados a las circunstancias propias de cada determinación.

Tabla 3.2 Lista de los reactivos usados en este proyecto.

Material	Fuente
L-aminoácidos	Merck
Péptidos	ICN Nutritional Biochemicals
Resinas de adsorción física	Sigma Chem. Co.
Carbón Activado	Química Trepic, S.A. de C.V.
Actibon A-61	Polifos S.A. de C.V.
DGR 8x30	Clarificantes Mexicanos SA de CV
Enzimas	
Pronase (grado B)	Calbiochem
Amano 2A	Amano Co.
Papaína	Hervi S.A.
HT proteolitic 2000	ENMEX S.A. de C.V.
Leche descremada en polvo	Producto francés
Caseinato de sodio	Arancia S.A. de C.V.
	Complementos Alimenticios S.A.
Sólidos de maíz hidrolizados	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, USA
Lecitina (Centrophase)	Central Soya, Chemurgy Div.
Mezcal de vitaminas VITALAC	Laboratorios ROCHE
Filtroayuda (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.

Tabla 3.3 Instrumentos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Equipo de cromatografía HPLC	WATERS, mod. 740
Detector de fluorometría	WATERS, mod. 420
Espectrofotómetro	SHIMADZU, mod UV-120-02
Termobalanza	OHAUS
Equipo Kjeldahl	LABCONCO
Baño control de temperatura	HAAKE, mod. E52
Medidor de pH	BECKMAN, mod. 3500

Tabla 3.4 Equipos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Equipos para reacción enzimática		
Bioflow (500ml)	New Brunswick Sci.	Mod. C30
Control de pH	" " "	Mod. PH22 y 40
Lh fermentation (13 l)	Lh	Mod. 2000 S-I
Incubadoras		
Enviromental Incubator	New Bruswick Sci.	Mod. G-24
Estufa de incubación	RIOSA	Mod. EC
Estufas		
Estufa de vacío	National Appliances Co.	Mod. 5831
Estufa de calentamiento	MAPSA	Mod. MDP-645
Mufla	LIDBUG	Mod. 51848
Centrifugas		
20000 rpm (lab)	DAMON/IEC Div.	Mod. IEC-HT
2100 rpm (planta pil.)	Mexicana de Maquinaria	Mod. S05-SPQ
Homogenizadoras		
	WARRICK Blender	
	SILVERSON	
Secador por asperción		
	NIRO ATOMIZER	

3.3.1 Métodos generales

* Determinación de aminoácidos y péptidos por el método de la ninhidrina. Se siguió la técnica de Moore y Stein (1948), descrita por Snell y Snell (1956).

* Determinación de aminoácidos y péptidos por espectrofotometría. Se siguieron las recomendaciones presentadas por Wetlanfer (1962).

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

* Determinación de tirosina con el reactivo de Foulin.

La concentración de tirosina, puede ser evaluada usando el reactivo de Foulin-Ciocaltenau, que forma un compuesto de color azul que puede ser cuantificado por espectrofotometría a 750 nm.

A 3 ml de la solución problema (que contenga entre 0 y 15 µg de Tir/ml), se le agragan 5 ml de NaOH (0.5 M) y 1.5 ml del reactivo de Foulin, diluido 1:3 en agua. Se agita y después de 25 minutos se determina la absorción de la solución resultante a 750 nm, contra un blanco de reactivos. La concentración se determina a partir de una curva patrón previamente preparada.

*** Hidrólisis ácida de proteína.**

En ampollitas de vidrio se ponen 1.5 ml de una solución de proteína al 10% y se agregan 2 ml de HCl 6N. Se hace un barrido con nitrógeno (para eliminar el oxígeno) durante 20-30 segundos. Se hace vacío a la ampollita durante 5-10 minutos. Se cierra la ampollita a la flama (manteniendo el vacío). Se coloca la ampollita en horno a 110°C durante 24 horas. Al final de este período se abre la ampollita y se filtra la solución para retirar el material carbonizado.

*** Determinación de aminoácidos por HPLC.**

Los aminoácidos (a excepción de Trp, Pro, Cis, Asn y Gln), fueron cuantificados por cromatografía en fase inversa, empleando una columna C18 con un gradiente de solventes acetonitrilo:agua, según lo descrito por McCaman y Robins (1962).

A una muestra previamente neutralizada (normalmente con NaOH al 20% P/F), se le agrega el estándar interno de fluorofenilalanina. Los aminoácidos son derivatizados con ortoftaldehído 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 aminoácidos (Val, Met, Ile, Leu y Fen). Únicamente se hacía análisis completo de aminoácidos en soluciones que se determinaba su importancia. Un ejemplo de cada tipo se presenta en las figuras 3.1 y 3.2, respectivamente.

* Análisis bromatológico. Las determinaciones de proteína y humedad se efectuaron de acuerdo a las técnicas del AOAC (1975).

3.3.2 Métodos particulares

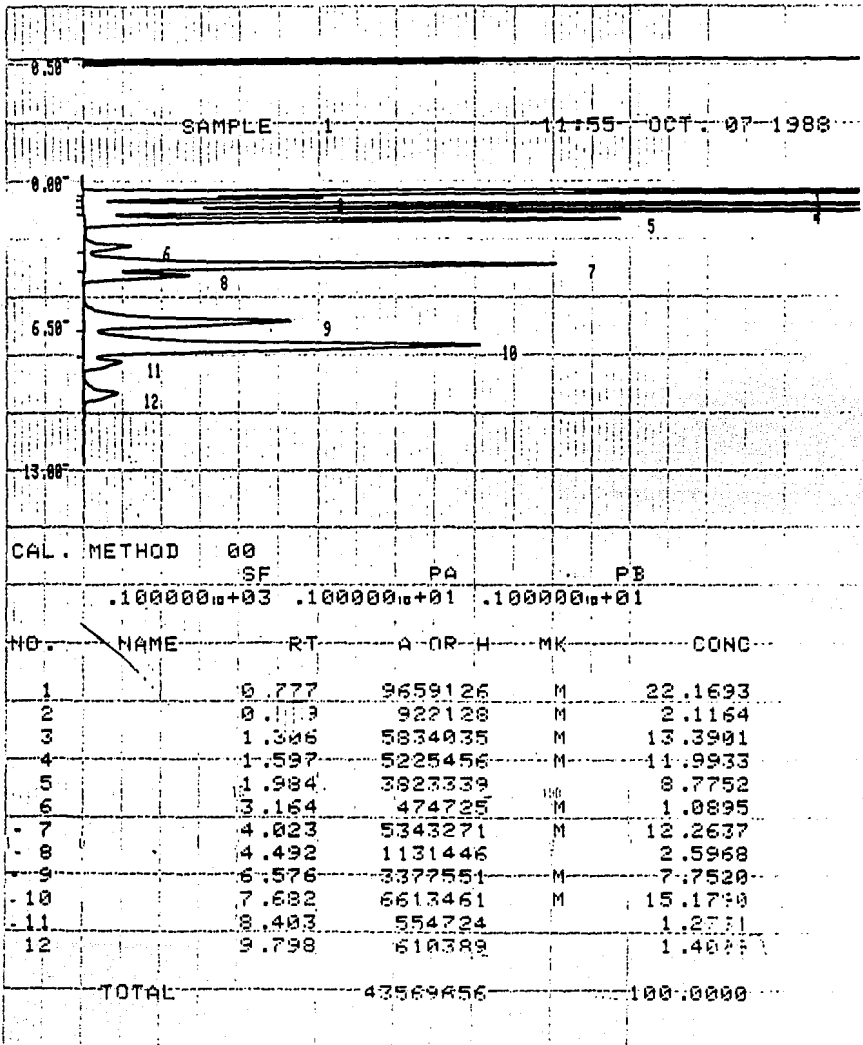
3.3.2.1 Reactivación de resinas de adsorción física

Las resinas XAD-2, XAD-4 y XAD-7 (20 g de cada una), tal como se obtienen del fabricante, son lavadas dos veces en agua. Una vez retirada el agua, se agregan 100 ml de HCl 1 N y se dejan en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se neutralizan con NaOH 1 M. Se lavan y almacenan en agua destilada.

Se determinó que tres gramos de resina activada eran suficientes para adsorber el 99% de la fenilalanina contenida en 10 ml de una solución al 0.1% (P/V). Tiempo de contacto 30 minutos con agitación a temperatura ambiente.

Se determinó la adsorción con estas resinas de Tir, Trp, Lis, Val, Cis, Met, Tre y del dipeptido aspartamo, poniendo 10 ml de una solución al 0.1% (P/V) con tres gramos de resina previamente activada, en iguales condiciones que para fenilalanina. La retención de cada aminoácido en el adsorbente se midió en el

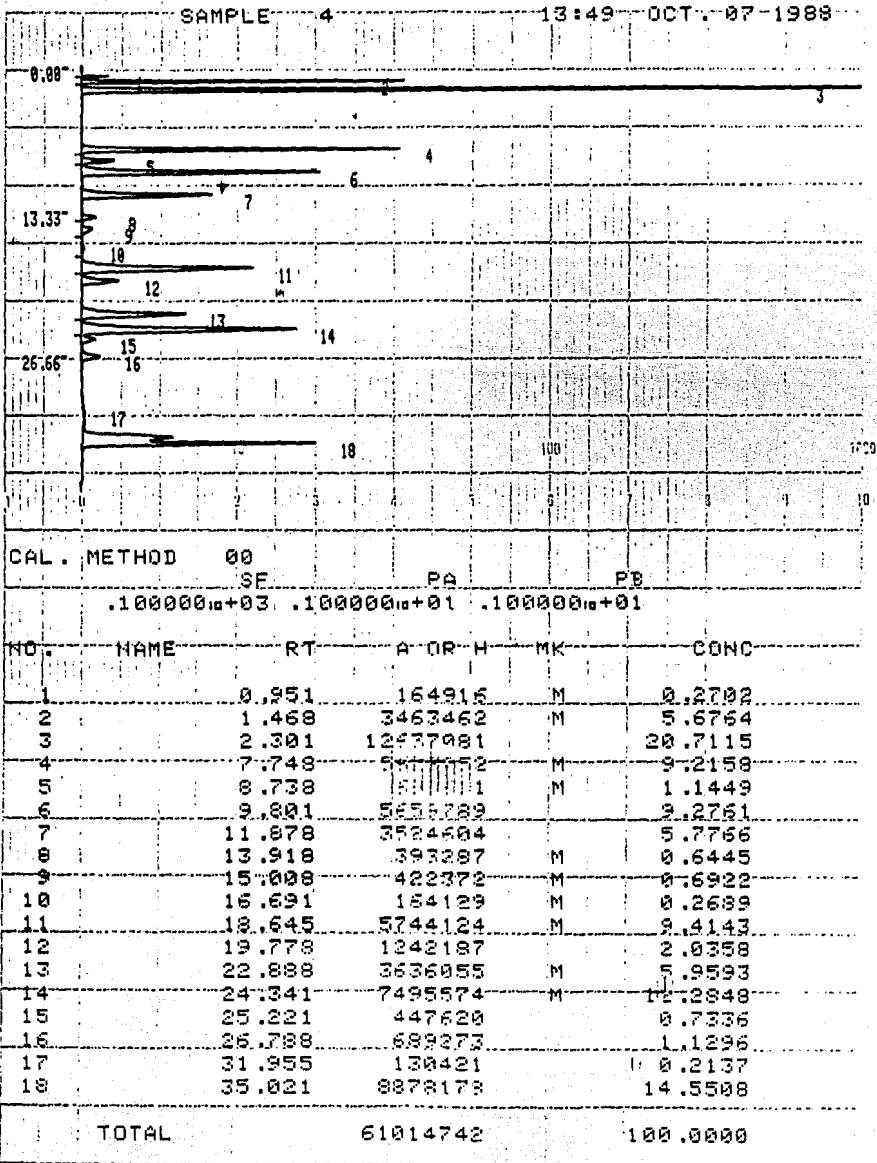
Figura 3.1 Resultado típico de un análisis parcial de aminoácidos por HPLC. La numeración corresponde a Val (7), Met (8), Leu (9), Ile (10), Fen (11), Estandar interno (12). El ejemplo corresponde al hidrolizado enzimático de caseína (S=10%), con Amano 2A-Papaína (E/S=1 y 2%, t=21 hr, T=50°C), después 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.



MILLIPON
S. C. Chem. Quality Division

176

Figura 3.2 Resultado típico de un análisis total de aminoácidos por HPLC. La figura muestra el análisis para el hidrolizado descrito en la Figura 3.1, tratado con un 5% de exceso del carbón activado necesario para retirar el 100% de Fen, Tir y Trp.



181

sobrenadante por el método de la ninhidrina , después de filtrar la mezcla.

3.3.2.2 Nitración de resinas

La reacción de nitración sobre la resina XAD-4 se llevó a cabo siguiendo los principios delineados por Groggins (1957) y usando las proporciones de reactivos recomendadas por Adams (1979).

Se hidratan 18.5 gramos de resina XAD-4 durante 30 minutos con agua destilada y se hacen dos lavados sucesivos con agua retirándose ésta por filtración. Se prepara mezcla de nitración (24 g de ácido nítrico y 16 g de ácido sulfúrico concentrados). Se pone la mezcla de reacción en baño de hielo y se agrega lentamente la resina hidratada. Una vez terminada la adición se pone el recipiente en baño de temperatura constante (60°C) durante 50-60 minutos. La resina cambia de un color crema a un color rojo oscuro. Se retira la mezcla de reacción por decantación y se lava la resina con agua. Se neutraliza con NaOH concentrado. Una vez neutralizada la resina se lava sucesivamente con agua hasta que ésta no presente color. La resina se almacena en agua destilada.

Las pruebas de adsorción se realizan con los aminoácidos listados en la sección 3.3.2.1, bajo los mismos criterios.

3.3.2.3 Reacción de Wohl-Aue

La resina nitrada (sección 3.3.2.2), 5 gramos, se mezclan con 100 ml de benceno y se agregan 10 gramos de KOH molido. Se agregan 5 ml de anilina y se pone a reflujo durante 12 horas. Una vez terminada la reacción se lava y neutraliza la resina. Se almacena en agua destilada.

Las pruebas de adsorción con estas resinas en condiciones similares a las presentadas en la sección 3.3.2.1.

3.3.2.4 Adsorción con carbón activado Actibon A61

El carbón tal cual fue suministrado por el fabricante fue usado en las pruebas de adsorción sin preparación previa.

Se determinó que 1 gramo de este carbón era suficiente para retirar el 99% de la fenilalanina contenida en 10 ml de una solución al 0.1% (P/V). Tiempo de contacto 2 horas en agitación a temperatura ambiente.

Se realizaron pruebas de adsorción física con los aminoácidos Tir, Trp, Trr, Lis, Val, Cis, Met y Tre, bajo las mismas condiciones que para fenilalanina. La adsorción de cada aminoácido en el carbón se determino por el método de la ninhidrina.

3.3.2.5 Adsorción de Fenilalanina con carbones CLARIMEX

Esta prueba corresponde a la determinación de adsorción de fenilalanina por los carbones activados DGR 8x30, VG 10x35 y Tipo 061. Los carbones se usaron en las condiciones en que son proporcionados por el fabricante y sin preparación previa.

Se muelen finamente los carbones. Se pesan 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 gramos de cada carbón. Se ponen en contacto con 10 ml de una solución de fenilalanina 0.02M, durante 1 hora a 25°C en vaso con agitación magnética.

Se determina la concentración del sobrenadante de cada solución, después de filtrar la mezcla, por el método de la ninhidrina.

3.3.2.6 Propiedades del carbón activado CLARIMEX DGR 8x30

Una vez seleccionado el material de adsorción se determinaron algunas de sus propiedades en base a lo descrito por Hassler (1974).

a) Densidad.

Se pesan tres muestras de 10 ml de carbón activado (tal cual lo proporciona el fabricante) y se obtiene el valor de densidad. El valor reportado es el promedio de las determinaciones.

b) Distribución de malla.

Se hace la distribución de malla (US) usando 100 gramos de carbón activado. Resultado promedio de dos determinaciones.

c) Humedad.

Se pesa una muestra de 10 gramos. Se introduce en una estufa a 25 mmHg de vacío y a una temperatura de 100°C durante 6 horas. Se retira la muestra de la estufa y se pone en un desecador a enfriar. Después de 2 horas se pesa. El por ciento de humedad será la diferencia del peso inicial menos el peso final entre el peso inicial. Valor reportado resultado de dos determinaciones.

d) pH.

Se pesan 2 gramos de carbón activado y se agregan a 50 ml de agua de pH 7. Se calienta a 90°C durante 5 minutos. Se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente y se realiza la medición de pH. El pH de la mezcla agua-carbón se mide mientras se agita. Valor reportado promedio de dos determinaciones.

e) Cenizas.

Se pesan 2 gramos de la muestra de carbón y se ponen en mufla a 600°C durante 2.5 horas. Se deja enfriar en desecador y se pesan. El resultado es el promedio de dos determinaciones y se da como por ciento en base húmeda.

3.3.2.7 Pruebas preliminares con carbón activado DGR Bx30

a) Influencia de la agitación.

Se usan dos tipos de agitación en estos experimentos: a) vaso de precipitado con y sin agitación y b) tubo de ensayo cerrados y agitación orbital.

A cada recipiente se agregan 10 ml de una solución 0.02 M de fenilalanina. Se agrega 1.0 gramos de carbón activado molido y se activa la agitación al valor prestablecido (en vaso de precipitado sin agitación, a 100 rpm y una agitación >250 rpm; en tubo de ensayo a 40 rpm). Temperatura de operación 25°C. Transcurridos 5 minutos se toman muestras y se filtran. La adsorción se mide como diferencia entre el valor inicial y el valor final de concentración, medido por ninhidrina.

b) Efecto del tamaño de partícula.

La experiencia en forma similar a la descrita en la sección 3.3.2.5, con la única variante que se usa carbón activado finamente molido y sin moler (muestra con carbón de malla <12).

c) Efecto del pH.

Experiencia en forma similar a la descrita en la sección 3.3.2.5, con la variante de que se usa el carbón activado DGR Bx30 molido en dos condiciones de pH. Una al pH que impone el carbón original y la segunda con el pH modificado.

La modificación del pH se obtiene poniendo carbón activado en agua destilada y agregando HCl 1 N, hasta que el pH de la solución sea igual a 5. Entonces se filtra y se seca en estufa a 60°C.

3.3.2.8 Isotermas de adsorción

En recipientes con temperatura controlada y agitación magnética se agragan 10 ml de una solución 0.04 M de fenilalanina esperando que alcancen la temperatura establecida. A cada recipiente se agrega una cantidad de carbón activado y se permite que alcancen el equilibrio. Las temperaturas elegidas fueron 10, 20 y 40°C. Las dosis de carbón activado molido fueron 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 gramos para cada temperatura. Se supuso que con una hora de contacto de la solución de fenilalanina con el carbón activado era suficiente para alcanzar el equilibrio. En experiencias posteriores de cinética de adsorción se observa que esta suposición es válida.

Después de una hora de contacto, la mezcla se filtra y se determina en el sobrenadante la concentración residual de fenilalanina por el método de la ninhidrina (éste es el valor de concentración de equilibrio). la cantidad de fenilalanina adsorbida por unidad de adsorbente se determina como la

diferencia entre la cantidad inicial menos la concentración de equilibrio.

3.3.2.9 Cinética de adsorción

En un recipiente con agitación magnética y temperatura controlada se ponen 30 ml de una solución 0.04 M de fenilalanina. Se agrega carbón activado (sin moler, malla <12) como si se fuese a eliminar fenilalanina (1 gramo) y se toman muestras de la solución a tiempos determinados. Las muestras se analizan por el método de la ninhidrina. Esta experiencia se repite a tres temperaturas diferentes.

3.3.2.10 Adsorción de aminoácidos

Se preparan soluciones 0.02M de Tre, Lis, Val, Pro, Glu, Met, e His. A 10 ml de cada solución se le agrega carbón activado (finamente molido) en la cantidad necesaria como si se fuese a eliminar fenilalanina (1 gramo) y se dejan en agitación por 30 minutos a una temperatura de 25°C. La cantidad adsorbida se calcula como la diferencia entre la cantidad del aminoácido inicial menos la cantidad final medidos por el método de la ninhidrina. Se pudo observar que a excepción de valina y prolina los otros aminoácidos podían ser evaluados con la curva patrón de fenilalanina.

Esta experiencia se repitió usando carbón activado con el pH modificado a un valor de 6. La modificación de pH como la descrita en 3.3.2.7.

3.3.2.11 Adsorción de péptidos

Se preparan soluciones de aspartamo (L-aspartil-L-fenilalanina-metil ester) de 5 mg/ml, glicilfenilalanina de 0.01 M, DL-alanil-DL-metionina de 0.01 M, di-triptófano de 0.004 M y tri-fenilalanina de 0.001 M (las concentraciones de estas últimas dos soluciones en este rango debido a la poca cantidad disponible). Se agrega la cantidad de carbón activado necesario como si se fuera a eliminar fenilalanina en la concentración de cada solución. Se evalúa la adsorción por espectrofotometría en UV para aspartame y Gli-Fen (260 nm), Trp-Trp (280 nm) y tri-Fen (257.5); para Ala-Met por el método de la ninhidrina, a partir de curvas patrón previamente preparadas.

3.3.2.12 Mezcla de aminoácidos con fenilalanina

Se preparan soluciones 0.02 M de Fen, Arg, Met, Lis, Val, Tre e His. A excepción de la fenilalanina ninguno de estos aminoácidos absorben la luz ultravioleta a 257.5 nm. Se preparan 10 ml de solución, mezclando 5 ml de fenilalanina y 5 ml de cada aminoácido. Se agregan 0.5 gramos de carbón activado. Se ponen en agitación durante 30 minutos a una temperatura de 25°C. Al final

se filtra y se mide la concentración de fenilalanina en el sobrenadante por espectrofotometría UV a 257.5 nm. La concentración final de cada aminoácido se determina por el método de la ninhidrina. El valor reportado para cada aminoácido será aquél obtenido por el método de la ninhidrina menos la concentración de fenilalanina determinada por espectrofotometría UV a 257.5 nm.

3.3.2.13 Curva de Actividad-Temperatura para la enzima Pronase.

Se preparan soluciones al 1% (F/V) de caseína. Se ponen 25 ml de la solución y se agrega la enzima (pronase) a un nivel de 1% E/S (ésto es 0.0025 gramos de enzima), cuando se ha alcanzado la temperatura de trabajo. Las temperaturas usadas fueron 35, 40, 45, 50, 55 y 60°C. A intervalos de tiempo se toman muestras y se precipitan por la técnica de TCA. Se filtran y al sobrenadante se le determina tirosina liberada por el método de Foulin.

Se hacen gráficas de mg de tirosina liberada por unidad de volumen vs tiempo a cada temperatura. De estas gráficas se determina la pendiente al inicio de la reacción (igual a la velocidad inicial, definida como mg de tirosina liberados por unidad de volumen por unidad de tiempo). Lo que se reporta es una gráfica de velocidad inicial vs temperatura.

3.3.2.14 Hidrólisis enzimática de leche.

En un matraz erlenmeyer de 125 ml se ponen 50 ml de agua y se agregan 8.33 gramos de leche (35% de proteína) para tener una solución al 5% (F/V) de proteína. Una vez alcanzada la temperatura de trabajo se agrega(n) la(s) enzima(s).

Se probaron las siguientes combinaciones de enzimas: Amano 2A-Pronase (A2A-P), HT proteolitic-Papaina-Pronase (HT-Pap-P), HT proteolitic-Pronase (HT-P) y Pronase (P). La secuencia y condiciones de reacción para cada hidrolizado se presenta en la Tabla 3.5.

Cada hidrolizado de la Tabla 3.5, se llevó a cabo por duplicado. Una vez agregada la primera enzima, se adiciona el benzoato de sodio al 0.1% (F/P) como preservador para evitar la contaminación microbiana.

Para evitar contaminación microbiana, los recipientes y el agua se esterilizan previamente en autoclave 15 minutos a 15 psig. La adición de leche, enzimas, benzoato de sodio y la toma de muestras se realiza en condiciones de asepsia.

Los matraces son tapados con tapones de gasa y cubiertas de papel aluminio. Una vez preparada la mezcla de reacción se coloca en incubadoras con agitación (100 rpm) y temperatura controlada.

Al terminar la reacción, se toma 1 ml del hidrolizado resultante 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 o 42). El sobrenadante se analiza para contenido de aminoácidos por HPLC.

3.3.2.15 Hidrólisis enzimática de caseinato con endo y exoproteasas.

En un frasco cilíndrico de 500 ml, se agregan 250 ml de agua destilada. Se disuelve caseinato al 10% P/V (25 gramos), a una temperatura de 50°C. Se estabiliza la temperatura de trabajo y se adiciona(n) la(s) enzima(s). Se pone en agitación a 100 rpm.

Se probaron las siguientes combinaciones de enzimas: Amano 2A-Pronase (A2A-P) y HT proteolitic-Amano 2A-Pronase (HT-A2A-P). En la Tabla 3.6 se presentan la secuencia y condiciones de reacción para cada hidrolizado.

Una vez terminada la reacción se procede como en 3.3.2.14, para el análisis de aminoácidos.

3.3.2.16 Hidrólisis de caseinato con endopeptidasas.

La preparación de soluciones igual que en 3.3.2.15. Las combinaciones de enzimas fueron: HT proteolitic (HT), HT proteolitic-Amano 2A (HT-A2A) y Amano 2A-Papaina (A2A-Pap). En la Tabla 3.7, se presenta la secuencia y condiciones de reacción para cada hidrolizado.

Una vez terminada la reacción se procede como en 3.3.2.14, para el análisis de aminoácidos.

3.3.2.17 Adsorción de fenilalanina presente en hidrolizados de leche.

Para estas pruebas se utilizaron los hidrolizados 1, 2, 3 y 4 (Tabla 3.5) de la sección 3.3.2.14.

A 20 ml del hidrolizado previamente desactivado térmicamente (10 min a ebullición), se agrega la cantidad de carbón activado con un 25% de exceso para retirar el 100% del contenido de Fen, Tir y Trp, calculado como se indica más adelante. Se pone en agitación a 100 rpm durante 40 min, a una temperatura de 25°C.

Una vez terminado el proceso de adsorción, se filtra o centrifuga y al sobrenadante se le analiza el contenido de aminoácidos.

El contenido de aminoácidos libres en solución después de la adsorción con carbón activado, se obtiene precipitando con TCA. Al sobrenadante se le analiza por HPLC.

El contenido de aminoácidos total después del proceso de adsorción, se obtiene realizando una hidrólisis ácida al sobrenadante y analizando por HPLC.

Tabla 3.5 Procesos seguidos en la hidrólisis enzimática de Leche (5% P/V)

Hidrolizado	Etapas I	Etapas II	Etapas III
1	HT+Pap., 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 (aprox. 1 ml)	Pronase, E/S=0.15% t=24 hr, T=50°C pH=7.4
2	A2A, E/S=1%, t=5hr T=50°C, pH de la solución	Igual al anterior	Igual al anterior
3	HT, E/S=1%, t=5hr T=50°C, pH de la solución	Igual al anterior	Igual al anterior
4	--	Ajuste de pH a 7.4	Igual al anterior

Tabla 3.6 Procesos de reacción enzimática de caseinato (S=10%) con exo y endopeptidasas

Hidrolizado	Etapas I	Etapas II	Etapas III	Etapas IV	Etapas V
5	A2A, E/S=1%, t=5hr T=50°C, pH de la solución	Desactivación térmica enzimas 10 min a ebullición	Pronase, E/S=1% t=19 hr, T=50°C pH de la solución	--	--
6	HT, E/S=2%, t=3hr T=50°C, pH de la solución	Igual al anterior	A2A, E/S=1%, t=4hr T=50°C, pH de la solución	Desactivación térmica de la enzima 10 min a ebullición	P, E/S=0.01% t=5hr, T=50°C pH de la solución
7	Igual al anterior	Igual al anterior	Igual al anterior	Igual al anterior	P, E/S=0.01% t=24 hr, T=60°C pH de la solución

Tabla 3.7 Procesos de reacción enzimática de caseinato (S=10%) con endopeptidasas

Hidrolizado	Etapas I	Etapas II	Etapas III
8	HT, E/S=2%, t=3hr T=50°C, pH de la solución	--	--
9	Igual al anterior	Desactivación térmica de la enzima 10 min a ebullición	A2A, E/S=1%, t=4hr T=50°C, pH de la solución
10	A2A+Pap, E/S=1 y 2% t=21hr, T=50°C, pH de la solución	--	--

-Cálculo de carbón activado para el proceso de adsorción.

El ejemplo que a continuación se presenta, supone el tratamiento de 20 ml de hidrolizado.

En leche descremada se tiene que Fen = 47.5 mg/g de proteína, Tir = 48.8 mg/g de proteína y Trp = 13.4 mg/g de proteína (Tabla 4.13).

Si se disuelven 8.33 gramos de leche descremada (con un contenido de 35% de proteína), en 50 ml de agua, se obtiene después de una hidrólisis de 24 horas con Amano 2A-Pronase, un volumen final de 58 ml (valor experimental de tres determinaciones).

Para el cálculo de la cantidad de carbón activado necesario para retirar Tir y Trp, se supone que el carbón adsorbe estos aminoácidos en la misma forma que lo hace con la fenilalanina (43 mg del aminoácido/g de carbón activado).

Entonces, para fenilalanina:

$$\frac{(8.33 \text{ g de leche}) (0.35 \text{ g de prot}) (47.5 \text{ mg de Fen}) (1 \text{ g de CA})}{(58 \text{ ml}) (1 \text{ g de leche}) (\text{g de prot}) (43 \text{ mg Fen})}$$

x20 ml=1.11 gramos de carbón activado

Procediendo de igual forma para Tir se requieren 1.14 g y para Trp se requieren 0.31 g. En total para retirar estos aminoácidos al 100% se requieren (1.11 + 1.14 + 0.31 =) 2.56 gramos de carbón activado. Con un 25% de exceso, serán (2.56x1.25=) 3.20 gramos de carbón activado.

3.3.2.18 Adsorción de fenilalanina presente en hidrolizados de caseinato.

Para estas pruebas se utilizaron los hidrolizados 8, 9 y 10 (Tabla 3.7) de la sección 3.3.2.16.

A 50 ml del hidrolizado previamente desactivado térmicamente, se le agrega la cantidad de carbón necesaria para retirar 85% del contenido de Fen, Tir y Trp en una prueba y en otra con 5% de exceso. Se ponen en agitación (200 rpm) por 40 minutos a una temperatura de 20°C.

Una vez terminado el proceso se filtra la solución. El sobrenadante es analizado para contenido de aminoácidos libres en solución (siguiendo la técnica de TCA) o bien para análisis de aminoácidos totales (siguiendo el proceso de hidrólisis ácida con HCl).

3.3.2.19 Análisis microbiológico.

La determinación del grado de contaminación microbiológica se cuantificó por medio de la técnica de cuenta en placa. El medio usado fue agar bacteriológico (20 g/l) con extracto de malta (15g/l).

Se siembra una muestra de 1 ml del hidrolizado en cajas petri y se ponen a incubar a 37°C. Se observaba el crecimiento microbiano a las 24 y 48 horas (pruebas por quintuplicado).

El tipo de microorganismos (tanto de los presentes en soluciones problema, como los obtenidos en caja petri), se determinaron únicamente por observación al microscopio, usando la técnica de tinción de Gram.

Capítulo IV Resultados

4.1 Método de separación de fenilalanina del hidrolizado enzimático.

Como primera etapa del presente trabajo se planteó la necesidad de elegir un sistema de separación de fenilalanina, adecuado al hidrolizado de leche descremada que se había obtenido en la primera parte del proyecto.

Se han descrito muchos métodos en la literatura para retirar fenilalanina o más bien los aminoácidos aromáticos de un hidrolizado enzimático de proteínas. En general se han realizado estudios cuya finalidad ha sido la eliminación del sabor amargo que presentan estos hidrolizados, cuyo origen se establece en la presencia de péptidos de longitud variable, en cuya composición se encuentra uno o más de los aminoácidos aromáticos (Sullivan y Jazo, 1972).

Uno de los métodos que se ha usado con frecuencia en la eliminación del sabor amargo de hidrolizados de proteínas ha sido la adsorción. Algunos de los materiales usados para este fin se presentan en la Tabla 4.1 (ver también la Tabla 2.2). Como se puede observar de tales tablas, las opciones para eliminar el sabor amargo son variadas, sin embargo, el material más usado ha sido el carbón activado desde que Murray y Baker (1952), propusieron su uso para el tratamiento de hidrolizados enzimáticos de caseína.

En virtud de lo mencionado anteriormente, se decidió explorar la posibilidad de eliminar la fenilalanina por medio de un proceso de adsorción.

4.2 Pruebas preliminares

Se realizaron pruebas con resinas de adsorción física comerciales (Rohm and Hass) disponibles en México, las mismas resinas modificadas químicamente y carbón activado. Las condiciones en que se llevaron a cabo estas pruebas se presentaron en el capítulo anterior.

4.2.1 Resultados de pruebas con resinas de adsorción comerciales

Se propuso usar resinas comerciales, que aunque tienen un alto costo, presentan la ventaja de ser reusables por regeneración después del proceso de adsorción.

Las resinas usadas en estas pruebas fueron las amberlitas XAD-2, XAD-4 y XAD-7 de Química Trepic S.A. (subsidiaria de Rohm and Hass, E.E.U.U.), que se recomiendan para retirar de

Tabla 4.1 Sistemas para eliminar el sabor amargo de hidrolizados enzimáticos de proteína

Sustrato	Enzima(s)	Adsorbente	% de eliminación	Eliminación del	Referencia
			de fenilalanina	sabor amargo	
Proteína de pescado y soya	Pepsina/Pronase	Sephadex 6-15	99/94	Si	Yamashita y col. (1976) *
Hidrolizados comerciales de caseína y soya	--	Duolite S-761	96	Si	Roland y col. (1978)
Hidrolizado comercial de caseína	--	Hexilepoxi Sepharosa	--	Si	Laladisidis y Sjoberg (1978)
Leche descremada	Fisina-Pronase	Talco	--	No	Helbig y col. (1980)
		Sephadex 6-10 y 25	--	No	
		Tierras de Fuller y BaSO ₄	--	No	
		PVC y Poliestireno	--	No	
		Lana de vidrio silanizado	--	No	
		Vidrio Pirex	--	No	
		Carbón comercial	--	No	
		Sephadex LH-20	--	50%	
		Celulosa peroxiacética	--	50%	
		Microfibra de vidrio	--	50%	
		Vidrio común molido	--	50%	
		β-ciclodextrina	--	Si	
Fibra de vidrio suave	--	Si			
Carbón activado Darco KB	--	Si			
Caseína	Enzima Rhozyme	Carbón activado (Acticromos ST/E)	36	Si	Cogan y col. (1981)
Leche descremada	Alcalasa	Carbon activado Darco KB	34	Si	Ma y col. (1983)

* El objetivo del estudio fue la preparación de un alimento para fenilcetonúricos

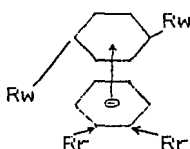
soluciones acuosas: fenol, compuestos orgánicos, antibióticos y pesticidas.

Para realizar las pruebas se siguieron las recomendaciones del fabricante (Anónimo, 1981). Los resultados se presentan en la Tabla 4.2 para la resina XAD-4. Como puede observarse, aunque la resina es altamente selectiva para los aminoácidos aromáticos (Fen, Tir y Trp), no discrimina entre los otros aminoácidos ensayados. Por tal motivo, se decidió intentar modificar las resinas químicamente buscando un cambio en la selectividad.

4.2.2 Modificación química de una resina de adsorción comercial

La modificación química que se pretendió buscar, fue el crear en la matriz de la resina (poliestireno) una afinidad específica por los grupos aromáticos, siguiendo el planteamiento de Forath (1978), de adsorción por transferencia de carga.

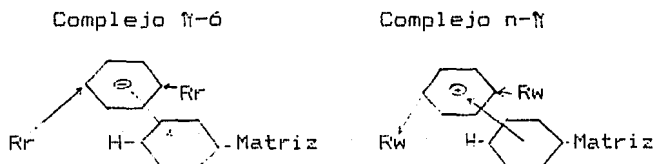
El principio de adsorción por transferencia de carga, se basa en la formación de complejos $\pi-\pi$, del tipo



donde: Rr = grupos que liberan electrones ($-\text{N}(\text{CH}_3)$, $-\text{O}(\text{CH}_3)$, $-\text{OH}$ y $-\text{CH}_3$)

Rw = grupos que atraen electrones ($-\text{SO}_3(\text{CH}_3)$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$ y $=\text{CO}$)

que serían complejos moleculares que podrían ser disociados. En este caso, la resonancia de los anillos provee el potencial para la formación del complejo. Este principio puede ser usado, teóricamente, aún cuando uno de los anillos esté unido a una matriz sólida, formandose los complejos:

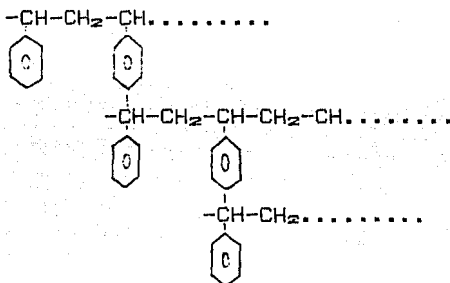


El problema con el uso de esta teoría, es que ha sido probada en sistemas en fase orgánica (por ejemplo, se pueden ver los trabajos de Grizzle 1982 y Okamoto 1984), pero se han realizado

pocos desarrollos en sistemas acuosos (Porath,1978), como sería el caso de un hidrolizado enzimático de proteínas.

Se uso la resina XAD-4 para intentar una modificación química, ya que es compatible con sistemas acuosos aunque su estructura primaria es la del poliestireno, que es altamente hidrofóbico.

En general el poliestireno es un polimero de vinilbenceno y divinilbenceno, que tendría una estructura del tipo (Toudeur,1977):



La primera modificación de la resina, fue una nitración directa de los anillos aromáticos de la matriz de poliestireno, siguiendo los principios delineados por Groggins (1957), para este tipo de reacciones .

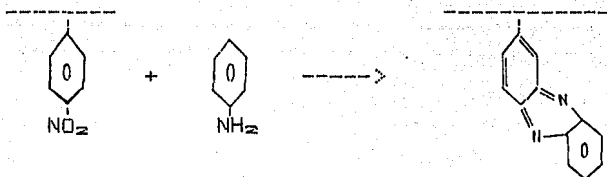
Los resultados de adsorción de aminoácidos para la resina XAD-4 modificada por nitración se presentan en la Tabla 4.2. Se puede observar que los intentos por modificar la resina no lograron el objetivo de aumentar la selectividad. Peor aun, en algunos casos aumentó la selectividad para aminoácidos que en la resina original no se adsorbían (por ejemplo para lisina). Esto pudo deberse a:

1) Por no conocerse la estructura exacta de la resina, sería difícil asegurar que la reacción que se pretendió llevar a cabo, se realizó.

2) No se puede asegurar que bajo las condiciones de reacción el "principio activo" original de adsorción en la resina, se eliminaba (el fabricante recomienda que estas resinas no sean puestas en contacto con sustancias oxidantes).

Esta misma reacción se pretendió llevar a cabo en poliestireno comercial, sin lograrse observar cambios aparentes en las perlas después del tratamiento.

A la resina XAD-4 supuestamente nitrada, se le intentó realizar la reacción de Wohl-Aue (descrita por Pachter,1951), que en principio es:



Sin embargo no se observó cambio alguno en las propiedades de adsorción de la resina modificada.

Debido a las dificultades que se encontraron al pretender realizar modificaciones químicas en las resinas XAD-4 y XAD-7 (resina de adsorción de matriz ester acrílico), se desistió de este enfoque por considerarse que ahondar más, estaba fuera del alcance del proyecto.

4.2.3 Adsorción de aminoácidos con carbón activado

Se realizaron pruebas de adsorción con carbón activado finamente molido, Actibon A-61 (distribuido por Polifos S.A. de C.V.). Los resultados se presentan en la Tabla 4.2. A partir de tales resultados, se pretendió usar este carbón para llevar a cabo la separación de fenilalanina. Sin embargo el distribuidor de este producto no pudo ser localizado. Aun así, se decidió continuar con este enfoque buscando entre productores y distribuidores nacionales de carbón activado, aquellos que pudieran suministrar uno que permitiera su uso en aplicaciones alimentarias.

4.3 Adsorción con carbón activado

Se obtuvieron muestras de carbón activado de la marca CLARIMEX, producidas por Clarificantes Mexicanos S.A. de C.V., única empresa en México que los elabora. Las propiedades de las muestras obtenidas se dan en la Tabla 4.3.

Las características de las muestras, de acuerdo al fabricante son (Anónimo, 1988):

- Clarimex 0.61 (carbon en polvo)

Carbón de origen vegetal de gran eficiencia, tipo neutro, útil para usarse en los siguientes procesos: refinación de

azúcar, tratamiento de agua potable, hule regenerado, tratamiento de bebidas alcohólicas, etc.

Tabla 4.2 Pruebas de adsorción de aminoácidos.
Por ciento de retención (1)

Aminoácido(2)	Amberlita XAD-4	Amberlita XAD-4 Nitrada	Carbón Activado
Fen	97	95	99
Tir	99(3)	92(3)	99
Trp	92(3)	77	99
Lis	19	77	0
Val	50	3	0
Cis	19	11	55
Met	40	65	40
Tre	26	18	0
Aspartame	96	85	N.D.

(1) Soluciones acuosas al 0.1%(P/V)

(2) Determinados por el método de ninhidrina

(3) Detección por absorción de UV

Tabla 4.3 Propiedades típicas de los carbones CLARIMEX
(Anónimo, 1988)

Propiedad	TIPO		
	0.61	VG 10X35	DGR 8X30
pH	6-8.5	Neutro	5-9
Humedad	12	-	12
Cenizas	12	-	23
Actividad Azul de metileno (g/100g min.)	25	-	24
Solubles en agua % máx.	4	-	1
Densidad aparente g/c.c.	0.35	-	0.4
Granulometría	Malla 200	-	8X30
Actividad mínima de de melazas (%)	98	-	95

- Clarimex VG 10X35 (carbón granular)

Carbón de origen vegetal, tipo ácido, útil para los sistemas continuos de decoloración en la industria química. Así como componente importante en los canisters (sistemas de anticontaminación en los automóviles), adsorción de vapores.

regeneración de disolventes, cartuchos de mascarillas, extractores de aire de cocina, etc.

- Clarimex DGR BX30 (carbón granular)

Carbón de origen mineral regenerable ideal por sus características de dureza y alta densidad para usarse en equipos de tratamiento de agua, productos farmacéuticos, productos alimenticios, etc.

4.3.1 Selección del carbón activado

Se realizaron pruebas de adsorción con los tres tipos de carbón. Los resultados se muestran en la Figura 4.1.

En virtud de los resultados de estas pruebas, se eligió el carbón activado DGR BX30, por las siguientes razones:

- a) Se obtiene la máxima eliminación de fenilalanina por unidad de peso de carbón activado.
- b) Aunque es el de mayor costo, este producto es regenerable.
- c) Se recomienda para uso en alimentos.

Se realizaron determinaciones de algunas propiedades del carbón activado de acuerdo a las técnicas descritas por Hassler (1974). Los resultados se dan en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4 Propiedades experimentales del carbón DGR BX30

Densidad g/10 ml de carbón (muestra original)	0.413
Distribución de malla (US) %	
<12	66.8
10-12	13.1
>10	26.1
Densidad g/10 ml de carbón (malla <12)	0.399
Humedad % (P/P) (malla <12)	7.85
pH (T=25°C) (agua de pH=7)	
- carbón granular en suspensión	7.9
- filtrado de carbón granular	6.7
- carbón molido en suspensión	8.6
- filtrado de carbón molido	8.5
% de cenizas (P/P) a 600°C	18.79

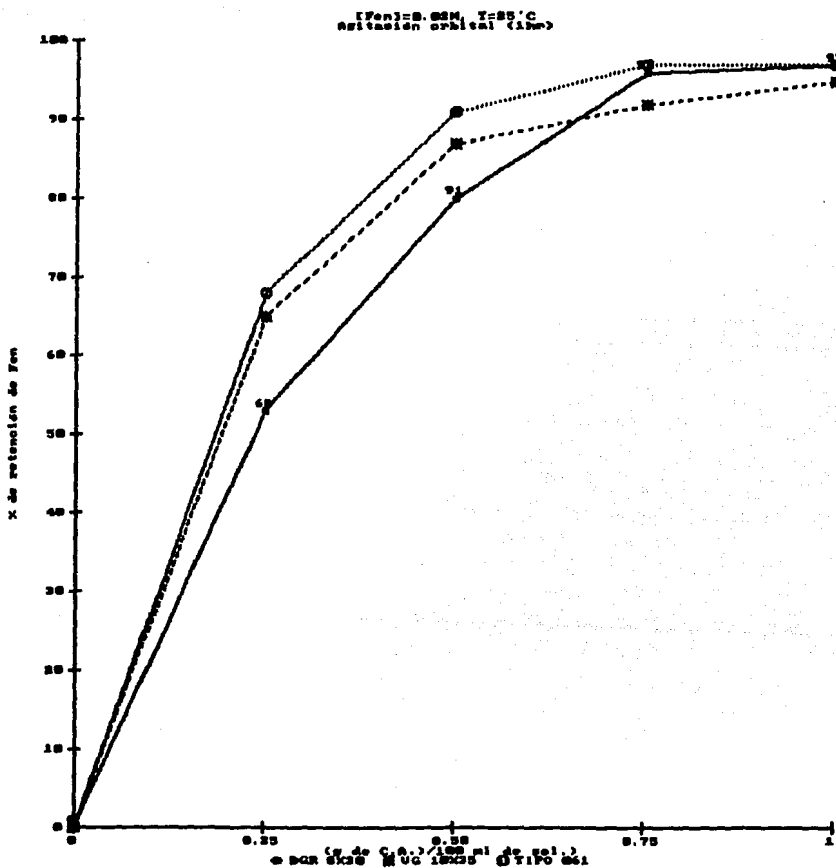


Figura 4.1 Retención de fenilalanina en carbon activado mineral (DGR 8x30) y vegetal (VG 10x35 y tipo 061) de Clarificantes Mexicanos S.A. de C.V.

4.3.2 Pruebas preliminares

Se realizaron pruebas que permitiesen determinar las condiciones bajo las cuales se podría llevar a cabo la caracterización del carbón activado DGR 8X30.

-Influencia de la agitación.

Para poder determinar el efecto de la transferencia de masa externa en el proceso de adsorción, se midió la retención de la fenilalanina por el carbón activado bajo diferentes condiciones de agitación. Los resultados se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5 Efecto de la agitación en la velocidad de adsorción

Condición	Velocidad de agitación	Retención de Fen (%)*
Vaso de p.p.	nula	90
Vaso c/agitación magnética	100 rpm	99
Vaso c/agitación magnética	>250 rpm	99
Tubo de ensayo, agitación orbital	40 rpm	99

* Tiempo de contacto: 5 minutos (T=25°C).

De la Tabla 4.5, se observa que no existe diferencia en los niveles de adsorción de fenilalanina en los sistemas con agitación ensayados. Sin embargo, la adsorción en el sistema sin agitación no es cuantitativa. Como conclusión se tiene que una agitación ligera es recomendable. Para fines de caracterización se usaron indistintamente los sistemas agitados magnéticamente o de tubo de ensayo con agitación orbital.

En tanques agitados, se puede describir el comportamiento de flujo de la solución mezclada en terminos del número de Reynolds. En un sistema de este tipo se define este grupo adimensional como:

$$N_{Re} = \frac{Da^2 \rho n}{\mu}$$

con Da = diámetro del impulsor, n = velocidad de agitación, ρ = densidad y μ = viscosidad de la solución. El flujo en el tanque se considera turbulento cuando $N_{Re} > 10000$ y de transición cuando su valor se encuentra entre 10 y 10000 (Perry, 1973).

Para el sistema con el que trabaja la densidad y viscosidad del hidrolizado son practicamente las del agua a la temperatura

de trabajo. Bajo estas condiciones el N_{re} es de aproximadamente de 1000. Sin embargo, durante el proceso de adsorción las condiciones cambian, en especial el valor de viscosidad, por lo que no se puede establecer un valor del número de Reynolds.

-Efecto del tamaño de partícula.

Se determinó la retención de fenilalanina con carbón activado DGR8X30, molido y sin moler, para observar las restricciones en la transferencia de masa interna. Los resultados se muestran en la Figura 4.2.

De la Figura 4.2, se puede observar que para el rango de retención que se busca (mayor a 95%), el uso de carbón activado molido y sin moler es indistinto, lo que permite presumir ausencia de restricciones en la transferencia de masa interna en las condiciones de los experimentos. Sin embargo, siguiendo las recomendaciones de Hassler (1974), las pruebas subsecuentes se llevaron a cabo preferencialmente con carbón activado molido.

-Efecto del pH.

De acuerdo a Hassler (1974), se puede esperar un cambio en la capacidad de adsorción del carbón activado, variando el pH del mismo. En particular, en el caso de ácidos orgánicos que se adsorben con carbones activados ácidos, se espera que se retengan mejor.

Se realizó una prueba acidificando el carbón elegido a un pH de 5. El resultado se presenta en la Figura 4.3. Como puede observarse no se presenta un cambio significativo en el perfil de adsorción de la fenilalanina.

En vista de lo anterior, se decidió usar el carbón DGR8X30, en las condiciones de pH en que es suministrado por el fabricante.

4.3.3 Isotermas de adsorción

Se efectuaron las determinaciones necesarias para obtener las isotermas de adsorción de fenilalanina por el carbón activado elegido. En la Figura 4.4, se presentan los resultados de graficar la cantidad de fenilalanina adsorbida por unidad de peso de carbón activado contra la concentración en equilibrio de fenilalanina. Se puede observar que al aumentar la temperatura la capacidad de adsorción de fenilalanina disminuye.

De acuerdo a Cheldelin (1942), los aminoácidos siguen adecuadamente la ecuación de la isoterma de adsorción de Freundlich, cuya expresión general es:

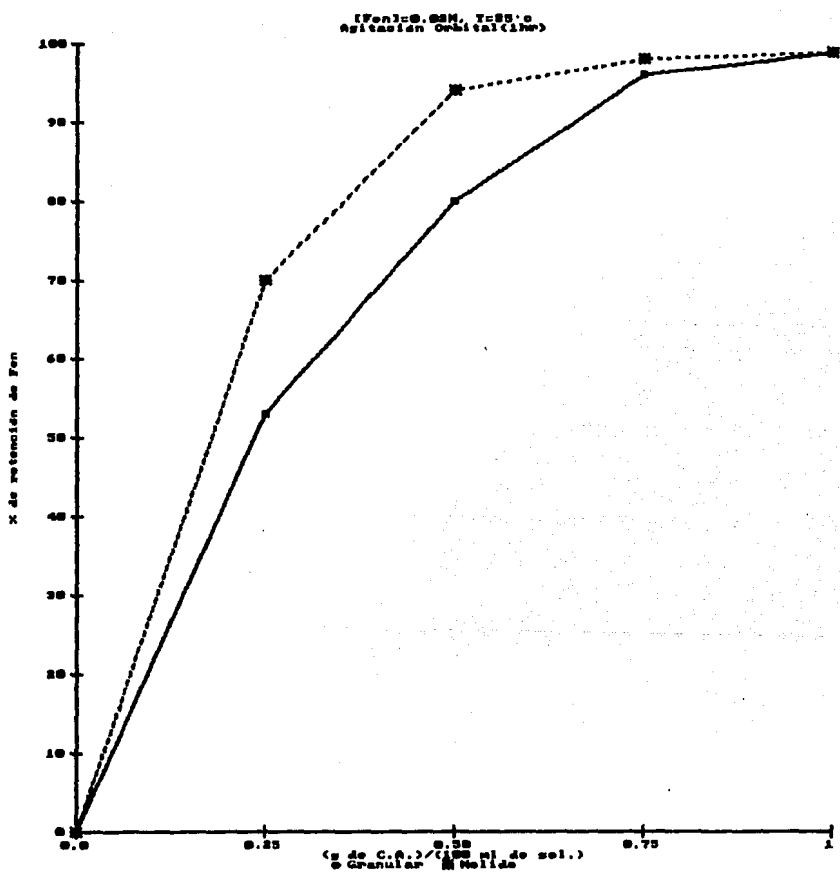


Figura 4.2 Efecto del tamaño de partícula en la adsorción de fenilalanina por carbón activado DGR 8x30.

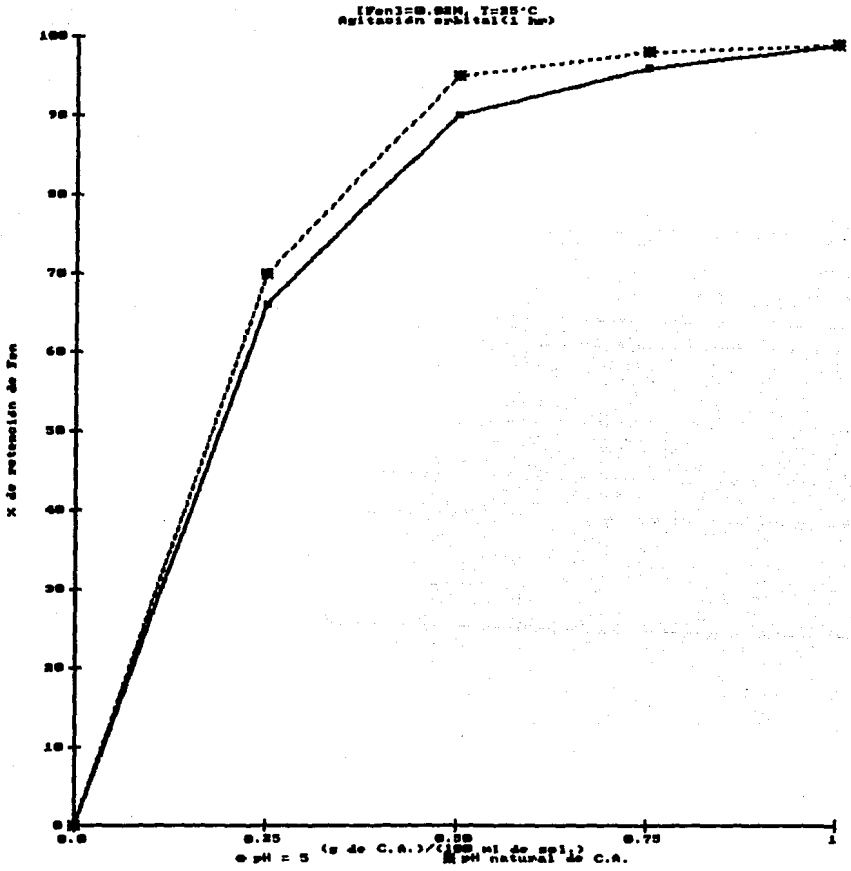


Figura 4.3 Efecto del pH del carbón activado (DGR 8x30) en la adsorción de fenilalanina.

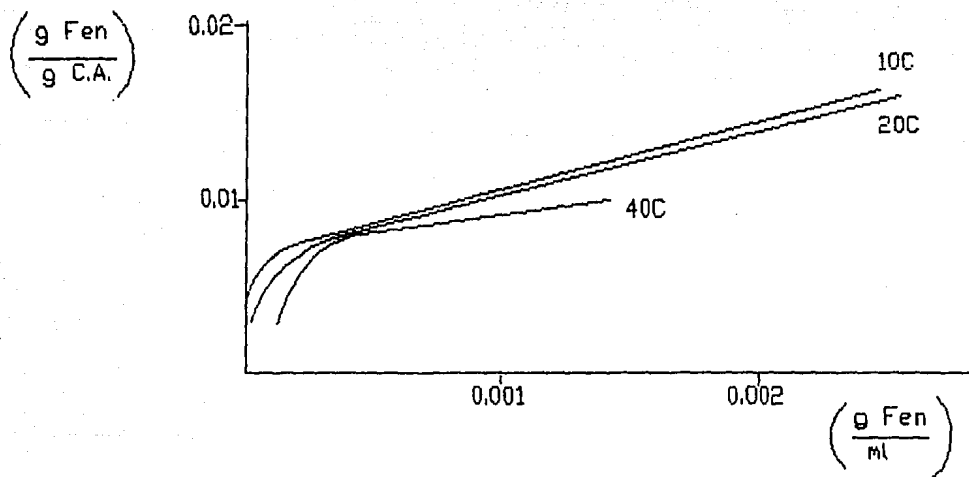


Fig. 4.4 Isothermas de adsorción para el sistema Fenilalanina-Carbón Activado DGR 8X30.

$$(1/n)$$

$$C_s = k C^*$$

donde C_s = peso de adsorbato adsorbido por unidad de adsorbente

C^* = concentración de adsorbato en equilibrio con el adsorbente

k y n = constantes, con $n > 1$

De acuerdo con Adamson (1976b), la ecuación de Freundlich es no lineal a bajas concentraciones, permanece convexa al eje de concentración y no muestra un valor de saturación o límite. Las constantes pueden obtenerse de graficar $\log(C_s)$ vs. $\log(C^*)$. En forma cualitativa, el intercepto da una medida de la capacidad de adsorción, mientras que la pendiente $1/n$, sería una medida de la intensidad de adsorción. Si los datos se ajustan a la ecuación, es probable que la superficie del adsorbente sea heterogénea. Básicamente la ecuación es empírica, limitada en su uso a la posibilidad de ajustar datos experimentales.

Por estas razones se adecuaron los datos experimentales a la forma logarítmica de la ecuación de Freundlich:

$$\log(C_s) = \log(k) + (1/n)\log(C^*)$$

En la Figura 4.5, se presenta el resultado de aplicar el modelo de Freundlich a los datos de adsorción de la figura 4.4.

De la figura 4.5, se obtienen por regresión lineal, los datos de los parámetros de la ecuación de Freundlich, que se resumen en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6 Valores de $\log(k)$ y $1/n$ de la ecuación de Freundlich para la adsorción de Fen por carbón activado.

Parámetro	Temperatura (°C)			Reportado T=25°C (Cheldelin, 1942)
	10	20	40	
$\log(k)$	-0.5363	-0.0447	0.0956	0.0023
$1/n$	0.1521	0.3020	0.6284	0.1
Coef. correl.	0.98	0.99	0.99	-

En la determinación de las isotermas de adsorción para aminoácidos realizadas por Cheldelin (1942), la discusión se limitó a interpretar el valor de $1/n$, estableciendo que para valores bajos de $1/n$ (menores a 0.4), la adsorción correspondía a grupos no polares y que valores mayores a 0.6 correspondía a la

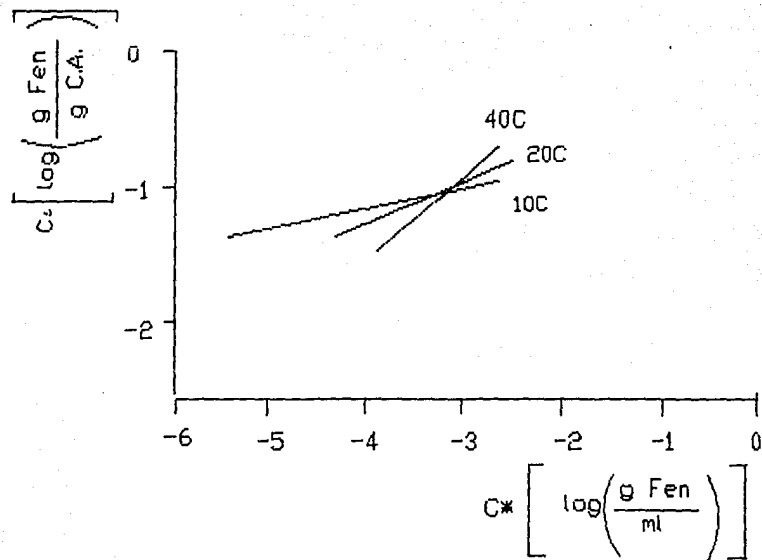


Figura 4.5 Ajuste de los datos de equilibrio (Fig. 4.4) al modelo de Freundlich en su forma logarítmica.

adsorción de grupos polares no aromáticos. Sin embargo, no explica la razón de tal comportamiento.

Experimentalmente se observó que la adsorción de fenilalanina era más eficiente a bajas temperaturas ($T=10^{\circ}\text{C}$), en concordancia con lo reportado por Cheldelin (1942).

Sin embargo, debido a que el uso de energía en la refrigeración a $T=10^{\circ}\text{C}$, aumentaría el costo de operación, se decidió trabajar a 20°C , donde de acuerdo a los datos experimentales, aún se espera una eficiente adsorción de grupos aromáticos ($1/n=0.3020$).

Adicionalmente se tuvo que la diferencia entre los valores de adsorción en equilibrio a las diferentes temperaturas no fue significativa, por lo que se eligió el valor de adsorción de 0.043 (g de Fen)/(g de carbón activado), obtenido a 20°C , como criterio para el diseño posterior del proceso

4.3.4 Cinética de adsorción.

Se obtuvieron las cinéticas de adsorción para la relación de 0.043 (g de Fen/g de carbón activado) determinada experimentalmente, a diferentes temperaturas con el fin de precisar el tiempo de adsorción óptimo. Los resultados de estas experiencias se presentan en la Figura 4.6.

Se puede observar que aproximadamente a los 15 minutos de iniciado el proceso, se alcanza la máxima adsorción y aún para tiempos altos de operación (80 minutos), no se detectó un desplazamiento del equilibrio hacia el aumento de retención del adsorbato o la liberación del mismo por parte del carbón activado.

En vista de lo anterior, se definió para toda prueba de adsorción posterior, un tiempo de contacto de 30 minutos. Estas experiencias permitieron validar la suposición que se había hecho de que el equilibrio se alcanzaba en un tiempo de una hora, en las determinaciones de las isotermas de adsorción y en general en todos los experimentos realizados antes del estudio cinético.

4.3.5 Adsorción de aminoácidos y péptidos

Una vez caracterizado el carbón y especificadas las condiciones bajo las cuales se debe operar, se realizaron determinaciones de adsorción de aminoácidos, péptidos y mezclas de los mismos, con el fin de observar su comportamiento frente al carbón activado y poder predecir, aunque cualitativamente, el fenómeno que se llevaría a cabo cuando se pusiera en contacto el hidrolizado proteico y el adsorbente.

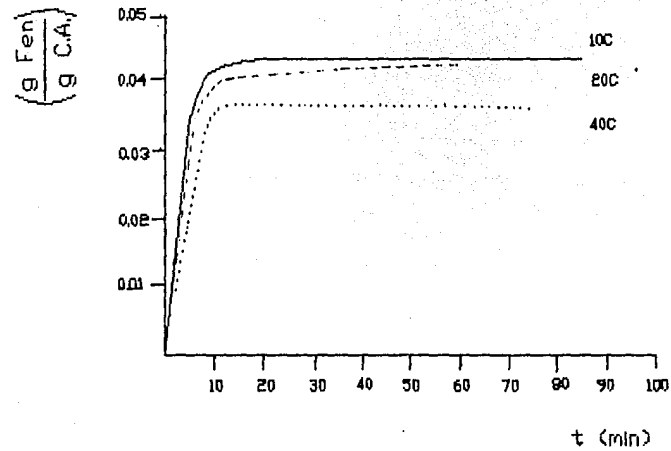


Figura 4.6 Cinéticas de adsorción para el sistema fenilalanina
carbon activado DGR 8x30.

- Adsorción de aminoácidos

Los aminoácidos probados fueron los esenciales, pues son los que en última instancia, de ser adsorbidos, afectan considerablemente el proceso. Es decir, las cantidades perdidas de estos aminoácidos deben ser restituidas en la formulación del alimento. Los resultados se presentan en la Tabla 4.7. Adicionalmente se realizó una prueba en que se varió el pH del carbón, con el fin de observar si este factor ejercía algún efecto en la adsorción de los aminoácidos (en la sección 4.3.2, se demostró que el pH del carbón activado no afecta la adsorción de fenilalanina).

Los resultados de la Tabla 4.7, demuestran que el carbón activado DGRØX30, no es selectivo únicamente para los aminoácidos aromáticos, sino que además adsorbe también una parte de los aminoácidos restantes.

Sin embargo, como era de esperarse es difícil encontrar un adsorbente que sea cien por ciento selectivo para una fracción de una mezcla y con nula adsorción para la fracción restante, sobre todo considerando que todos los aminoácidos poseen una estructura química similar.

Tabla 4.7 Adsorción de aminoácidos con carbón activado DGRØX30

Aminoácido	% de retención		Comentario(*)
	pH original	pH = 6	
Fenilalanina	99	99	Tir, Trp
Treonina	0	20	Ser
Lisina	23	25	Arg
Valina	35	35	Gli, Ala, Ile, Leu
Prolina	38	N.D.	Asp, Arn, Glu
Glutamina	40	N.D.	-
Metionina	83	78	Cys
Histidina	83	N.D.	-

(*) Aminoácidos que se esperaba que siguieran el mismo patrón de adsorción por su similitud estructural.

Aunado a lo anterior está el hecho, de que el hidrolizado de proteína con el que se pretendía trabajar, no era de aminoácidos libres, sino que además contenía péptidos de longitud variable en los cuales estaría incluida la fenilalanina (como lo había demostrado Lara (1988), en trabajos con leche, en los que los hidrolizados contenían fenilalanina 50% en forma libre y el resto incluida en péptidos). Por esta razón, aunque se hubiese tenido un adsorbente muy selectivo, de cualquier forma se perdería una fracción de los aminoácidos restantes cuando estuvieran unidos a los aminoácidos aromáticos en un péptido.

-Adsorción de péptidos

Se probaron algunos péptidos con el fin de determinar el efecto en la adsorción de fenilalanina cuando se encuentra unida a otro(s) aminoácido(s). Los resultados se muestran en la Tabla 4.8.

En el caso de dipéptidos se observa claramente que no existe un impedimento a la adsorción de fenilalanina por la presencia de otro aminoácido. Sin embargo, la adsorción no fue cuantitativa en el caso del péptido trifenilalanina, sin encontrarse una explicación al fenómeno. Probablemente el error experimental afectó la medición, pues se disponía de trazas de este tri péptido.

Tabla 4.8 Adsorción de péptidos con carbón activado

Féptido	% de retención
Aspartame(*)	99
Gli-Fen	99
Trp-Trp	94
DL-Ala-DL-Met	66
Fen-Fen-Fen	63

(*) L-aspartil-L-fenilalanina metil ester

Por otro lado, en el caso del dipéptido Ala-Met, la adsorción no fue tan alta como podría esperarse para la metionina (80%), ni tan baja como la de la alanina sola (30%) (ver Tabla 4.7), sino que resultó ser el promedio de ambos valores (66% de retención).

- Mezcla de aminoácidos con Fenilalanina

Se realizaron mezclas de aminoácidos con fenilalanina, para observar su comportamiento en el proceso de adsorción. Los resultados se reportan en la Tabla 4.9.

De la Tabla 4.9, se puede notar que en general los aminoácidos conservan su nivel de adsorción en el carbón activado solos o en mezcla. Sin embargo, para los aminoácidos metionina e histidina, que por si solos se adsorben fuertemente, en presencia de fenilalanina se inhibe su adsorción, posiblemente por competencia por un sitio de adsorción común, al cual la fenilalanina es más afín.

Tabla 4.9 Adsorción de fenilalanina en presencia de otros aminoácidos.

Aminoácido mezclado con Fen	% de retención	
	Fen	Aminoácido en mezcla
Arginina	99	40
Metionina	99	50
Lisina	99	22
Valina	99	20
Treonina	99	0
Histidina	99	28

4.3.6 Resumen

Como conclusión de las experiencias anteriores, se determinaron las condiciones para realizar la adsorción de fenilalanina del hidrolizado de proteína. Estas se presentan en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10 Condiciones de uso del carbón activado DGR8X30 para la adsorción de fenilalanina.

Parámetro	Valor/condición
Fabricante	Clarificantes Mexicanos S.A. de C.V.
Forma física	Granular
Origen	Mineral
pH de uso	Valor impuesto por el material
Temperatura de operación	20°C
Tiempo de contacto batch	30 minutos a 250 rpm
Relación (Fen/Carbon)	0.043 gramos de Fen/gramo de carbón
Aminoácidos retenidos fuertemente (>50%)	Trp, Fen, Tir, His, Met y Cis
Selectividad aparente del carbón activado	Trp>Fen=Tir>Met=His=Cis>Gli=Ala=Val=Ile=Leu=Pro>Arg=Lis=Asn=Gln>Asp=Glu=Ser=Tre

Es de notar que para carbones granulares, el equipo idóneo para operar, es un lecho fijo. Sin embargo, como se establecerá más adelante, el tamaño de los lotes que se requiere producir para la demanda del Programa de Prevención del Retraso Mental, no justifica el uso de equipo de operación continua como lo es un lecho fijo.

4.4 Hidrolizados de proteína

En los trabajos realizados por Lara (1988), 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 4.11, se da un resumen de las combinaciones de enzimas que llevaron a la selección del proceso.

Se puede observar de la Tabla 4.11 que la hidrólisis enzimática de leche descremada al 5%, llevada a cabo por Amano 2A a 50°C con una relación E/S de 1%, seguida por una hidrólisis con PRONASE a 40°C y una (E/S)=0.75%, resulta en la mas 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 la enzima resulta excesivo. Esta situación se deriva del hecho de que el costo de la enzima Pronase es muy alto, aproximadamente de 20,000 dólares/Kg. 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 aproximado de 150 dólares. Si el costo de la leche en polvo se toma como 2 dólares/Kg, resulta 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 este motivo, se decidió llevar a cabo una optimización en la cantidad de PRONASE agregada al proceso, con el fin de buscar una reducción sustancial en la cantidad y por ende en el costo de esta enzima.

La primera etapa de este proceso fue la caracterización de la enzima Pronase. La Pronase es una mezcla de enzimas endo y exoproteolíticas que se obtienen del microorganismo Streptomyces griseus. Esta mezcla tiene la característica de tener muy poca especificidad en su acción sobre enlaces peptídicos. Esto es, muy pocos enlaces peptídicos son totalmente resistentes a la hidrólisis cuando las condiciones son óptimas. Se ha demostrado que aproximadamente 75% de las uniones en caseína, 87% de los enlaces en ovalbumina y 80% de los enlaces en gluten de trigo, son hidrolizados después de una reacción con esta enzima por 72 horas a pH de 7.4 y a 40°C, con una relación E/S de 0.5%. Adicionalmente, muchos aminoácidos se presentan en forma libre en estos hidrolizados. Por ejemplo, 45% del total de ácido aspártico, 94% del total de metionina, 61% de valina y leucina y 74% de la lisina en caseína hidrolizada con pronase, se encontraron como aminoácidos libres (Hill, 1965).

En un análisis de las condiciones de reacción de las hidrólisis de la Tabla 4.11, se determinó que las hidrólisis con Amano 2A-Pronase se llevaban a cabo al pH que imponía la mezcla de reacción. Esto es, al inicio de la reacción el pH de la solución de leche era de aproximadamente 6.8 y al final de la reacción con Amano 2A el pH era de aproximadamente 6, manteniéndose más o menos constante durante la hidrólisis con

Pronase. Se concluyó entonces que si la hidrólisis de caseína reportada por Hill (1965), se manejó bajo condiciones óptimas, nuestra hidrólisis podría ser mejorada si se variaba este parámetro.

Tabla 4.11 Resultado de hidrólisis de leche descremada (Lara, 1988)

Proteasa(s)	[S]	(E/S)	T°C	Tiempo de reacción hr	mg de Fen liberados g de prot. inicial
A2A	1	1	50	5	12.7
A2A	3	1	50	5	12.3
A2A	5	1	50	5	7.2
A2A	10	1	50	5	12.0
A2A+HT	10	1-2	50	4	11.0
A2A+Pap	10	1-2	50	4	8.4
A2A+N	10	1-0.5	50	4	15.0
A2A/Pro	10	1-1.5	50/40	5/5	15.0
A2A/Pro	10	1-1.5	50/40	5/24	26.0
A2A/Pro	5	1-1.5	50/40	5/5	22.0
A2A/Pro	5	1-1.5	50/40	5/24	24.0
A2A/Pro	3	1-1.5	50/40	5/5	22.0
A2A/Pro	1	1-1.5	50/40	5/5	23.0
A2A/Pro	5	1-0.75	50/40	5/24	27.6
A2A/Pro	5	1-0.5	50-40	5/24	26.7
A2A/Pro	5	1-0.25	50/40	5/24	22.5
A2A/Pro	5	1-0.1	50/40	5/24	19.0
A2A/Pro	5	1-0.1	50/45	5/24	14.3
A2A/Pro	5	1-0.1	50/50	5/24	16.5
A2A/Pro	5	1-0.1	50/55	5/24	18.5

Notas: A2A=Amano 2A, HT=HT proteolitic 2000, Pap=Papaína.

N=Neutrasa, Pro=Pronasa

[S] = concentración de proteína en la mezcla de reacción.
(% en peso/volumen)

(E/S) = relación enzima-sustrato (% en peso)

A continuación se midió la actividad de la enzima a diferentes temperaturas, resultando el perfil de actividad que se muestra en la Figura 4.7.

En la Figura 4.7 se puede observar claramente que la máxima actividad se sitúa alrededor de 60°C, lo que significa que la reacción definida puede efectuarse a una mayor temperatura. Adicionalmente, queda el hecho de que la reacción llevada a cabo a la temperatura de 40°C, es susceptible de contaminación microbiana, lo que resulta en un producto inaceptable para los objetivos del proyecto.

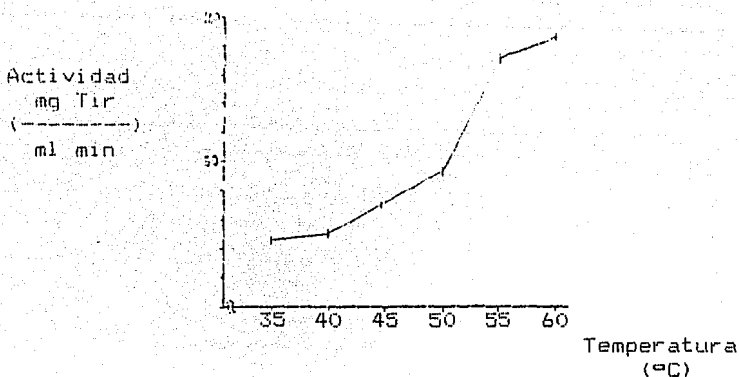


Figura 4.7. Curva de Actividad-Temperatura para Pronase

Finalmente, de acuerdo a Hill (1965), la reacción con proteasas seguida de reacción con Pronase, no cambia mucho el resultado final en cuanto al grado de hidrólisis obtenido, con respecto a la reacción únicamente con Pronase (ver Figura 4.8).

Con esta información, se puede concluir que el proceso definido puede aun mejorarse, específicamente en lo que a temperatura, pH y relación E/S se refiere.

Para cumplir con este fin, se planteó realizar una serie de hidrólisis en las cuales se modificaron los siguientes puntos con respecto a la hidrólisis previamente definida:

a) Disminuir la cantidad de Pronase de una relación E/S de 0.75 a 0.15 (reducción aproximada de 5 veces).

b) Aumentar la temperatura de reacción en 5°C, para compensar por la disminución en la concentración de enzima, con el fin de observar si el rendimiento de liberación en fenilalanina se podía mantener.

c) Controlar el pH de la reacción con Pronase, al valor reportado de 7.4.

d) Efectuar experimentos con otras enzimas proteolíticas diferentes a Amano 2A, en particular con HT-Proteolitic 2000 y Papaina.

e) Agregar un agente de conservación (benzoato de sodio al 0.1%) como preservador para evitar la contaminación microbiana.

Los resultados se presentan en forma resumida en la Tabla 4.12.

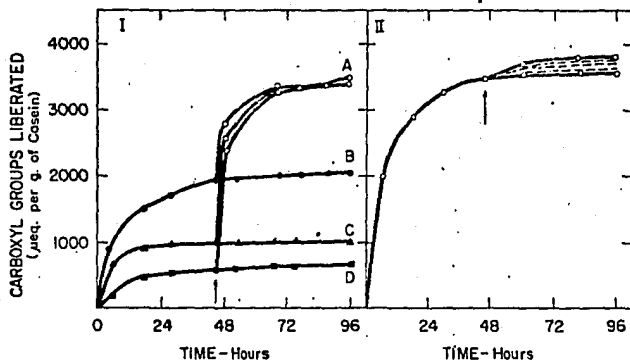


FIG. 4.8 Hydrolysis of casein by several proteinases. I. Hydrolysis of casein by trypsin (Δ), chymotrypsin (\square), or subtilisin (\bullet) followed by *S. griseus* protease (\circ). Curves B, C, and D indicate the extent of hydrolysis by individual enzymes without addition of *S. griseus* protease. Curve A indicates the extent of hydrolysis when *S. griseus* protease is added to the hydrolyzate of one of the other proteinases after approximately 47 hr. II. Hydrolysis of casein by *S. griseus* protease followed by hydrolysis with trypsin, chymotrypsin, subtilisin, or pepsin. The latter enzymes were added to the protease hydrolyzate after approximately 47 hr.

Tabla 4.12 Liberación de fenilalanina en hidrolizados enzimáticos de leche descremada (T = 45°C).

Proteasa(s)	E/S	[S]	Tiempo de reacción (Horas)	mq de Fen (*) g de proteína
Pronase	0.15	5	24	18.9
Amano/Pronase	1.0/0.15	5	5/24	27.1
HT/Pronase	1.0/0.15	5	5/24	26.3
HT+Pap/Pronase	1+2/0.15	5	2/24	19.1

(*) Promedio de dos hidrólisis

Los datos presentados en la Tabla 4.12, permiten visualizar que el rendimiento se mantiene en el mismo orden de magnitud a pesar de haber disminuido la dosis de enzima (de 0.75 a 0.15%), debido a los cambios realizados.

Aunado a lo anterior, el uso de HT-Proteolitic resultó en una liberación similar a la efectuada usando Amano 2A, con lo cual se podía tener una disminución en costos ya que la enzima HT tiene un costo de 10 dólares/Kg, contra 100 dólares/Kg de Amano, si la combinación HT-Pronase hubiese sido elegida.

Por último, el aumento de temperatura y la adición de benzoato de sodio como conservador, eliminaron el problema de contaminación en los hidrolizados durante la reacción. Sin embargo, las muestras presentaban problemas de contaminación microbiana durante el tratamiento de adsorción con carbón activado, cuando este por alguna razón, tenía que hacerse de un día para otro aun cuando las muestras fueran refrigeradas.

Aunque mediante las modificaciones en las condiciones del proceso se logró disminuir la cantidad de enzima, el costo de ésta seguía siendo oneroso para el proceso, ya que para el procesamiento de un kilogramo de proteína, el costo de enzima era de 30 dólares contra 6 dólares del sustrato, ésto es, 5 veces más.

4.4.1 Cambio en el sustrato de la reacción de hidrólisis

Debido a los problemas de contaminación microbiana de los hidrolizados de leche y a las dificultades en el uso de estos hidrolizados durante la operación de adsorción con carbón activado (ver sección 4.5), se optó por un cambio en el sustrato de la reacción. El cambio propuesto fue el uso de caseinato de sodio en lugar de leche descremada para analizar estos factores cuando el sustrato no tuviera material fermentable.

Se eligió este sustrato debido a que su composición en aminoácidos es similar a la de leche descremada (Tabla 4.13), cuya proteína es 85% caseína, lo que implicaría en principio que la especificidad de las enzimas usadas hasta este punto no

cambiaría. En la elección del caseinato de sodio se tomó también en cuenta que es relativamente fácil de disolver en agua.

Tabla 4.13 Composición de aminoácidos de las materias primas usadas en este proyecto (FAO,1970)

Aminoácido	Caseína (g de a.a./100 g de proteína)	Leche descremada
Asp	7.13	7.67
Glu	22.04	20.50
Val	6.74	6.31
Leu	9.51	9.72
Ile	5.41	5.18
Fen	5.24	4.75
Tir	5.82	4.88
Trp	1.61	1.34
Pro	11.58	11.54
Met	2.79	2.50
Cis	0.36	0.92
Lis	8.12	7.11
His	2.92	2.81
Tre	4.66	4.13

En virtud de los resultados de la primera etapa de la optimización (ver Tabla 4.12), se decidió continuar esta tarea, buscando disminuir la cantidad de Pronase a niveles que hiciesen al proceso económicamente factible.

En la Tabla 4.14, se presentan los resultados de hidrólisis de caseína, en las que se disminuyó la cantidad de Pronase, se aumentó la temperatura y se usó HT-proteolitic seguida de la hidrólisis Amano-2A - Pronase, para diferentes tiempos de reacción.

Se observa de estos experimentos (Tabla 4.14) que la liberación de fenilalanina, se mantenía en el mismo orden de magnitud que cuando se usaba E/S de 0.15 en el caso de leche, si se aumentaba la temperatura en 10°C y E/S para Pronase se disminuía a 0.01%.

Sin embargo, cuando al proceso se le aumentaba una etapa con una endopeptidasa (HT-proteolitic), la liberación de fenilalanina disminuía notablemente si la temperatura se disminuía en 5°C, aun para tiempos largos de reacción con Pronase (24 en lugar de 19 horas).

Ante esta situación y considerando que la disponibilidad de enzimas exoproteolíticas es baja y que aun a dosis extremadamente reducidas, el costo de la Pronase incidía fuertemente en el costo de producción, se decidió analizar el efecto de la separación por adsorción en hidrolizados obtenidos con endopeptidasas únicamente.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Tabla 4.14. Liberación de fenilalanina en hidrolizados de caseinato de sodio.

Enzima	E/S	[S]	Tiempo de Reac. (Hr)	T°C	mg Fen liberados g de proteína
A2A-Pro	2/0.05	10	5/19	50/60	21.40
HT/A2A/Pro	2/1/0.01	10	3/4/5	50/50/45	15.00
HT/A2A/Pro	2/1/0.01	10	3/4/24	50/50/45	17.60

De antemano se preveía una pérdida en los aminoácidos ligados a aquellos que son adsorbidos fuertemente en el carbón activado, debido a que el uso de enzimas endopeptidicas disminuye la liberación de tales aminoácidos durante la reacción. Esto implicaba que se tendría que evaluar económicamente la pérdida adicional en aminoácidos (que tuvieran que ser restituidos) contra el costo del uso de una enzima exopeptidica, en este caso Pronase.

En la Tabla 4.15, se presentan los resultados para hidrolizados de caseína con endopeptidasas.

En una evaluación del trabajo realizado hasta este punto se concluyó que se usaría el sistema enzimático Amano 2A-Papaína en forma simultanea, con una E/S de 1 y 2 respectivamente, sobre caseinato de sodio (S) al 10%, a una temperatura de 50°C y durante un periodo de 20 horas, por las siguientes razones:

1) Resulta el sistema de enzimas endopeptidicas con el que se obtiene la máxima liberación de fenilalanina, para las condiciones y combinaciones probadas.

2) Son enzimas disponibles en México.

3) El costo de estas enzimas resulta ser el más bajo (a excepción de HT-proteolitic) de las enzimas ensayadas (100 y 50 dólares/Kg respectivamente).

4) Los hidrolizados de caseinato de sodio con estas enzimas a las condiciones propuestas no presentan problemas de contaminación microbiana.

5) Las dos enzimas estan autorizadas por la FDA, para su utilización en alimentos.

Tabla 4.15 Liberación de fenilalanina en hidrolizados enzimáticos de caseinato de sodio.

Enzima	E/S	[S]	Tiempo de Reac. (Hr)	T°C	mg Fen liberados g de proteína
HT	2	10	3	50	<1
HT+A2A	2/1	10	3/4	50/50	13.5
A2A+Papaína	1/2	10	21	50	16.5

4.5 Eliminación de fenilalanina de hidrolizados de proteína.

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 (Tabla 4.10).

En la Tabla 4.16, se resumen los resultados de adsorción de fenilalanina con carbón activado para diversos hidrolizados de leche descremada. En la Tabla 4.17 se presentan los resultados de análisis parcial de aminoácidos y en la Tabla 4.18 los resultados del análisis total de aminoácidos en los hidrolizados después del proceso de adsorción.

Se observa de la Tabla 4.16 que el carbón activado mineral y vegetal tienen la misma afinidad por la fenilalanina en los hidrolizados probados, mientras que la resina modificada XAD-4 es la que menor afinidad presentó por este aminoácido.

Se determinó experimentalmente, que la tirosina y el triptófano tienen que ser considerados como si fueran fenilalanina en el cálculo de carbón activado necesario para retirarla cuantitativamente, ya que la adsorción de estos aminoácidos es similares.

De la Tabla 4.17 se puede observar que con el hidrolizado Amano 2A-Pronase, se obtuvo la mayor cantidad de aminoácidos libres en solución después del tratamiento con carbón activado (tanto mineral como vegetal), debido quizás a que esta mezcla de enzimas es la que produce el grado de hidrólisis más extenso.

En la Tabla 4.18, se presentan los resultados del análisis total de aminoácidos por HPLC, de los diversos hidrolizados ensayados después del tratamiento con carbón activado. Una vez más, se puede observar que con el hidrolizado de Amano 2A-Pronase tratado con carbón activado (mineral y vegetal) se obtiene la menor retención de los aminoácidos en general, con respecto a los otros hidrolizados.

Como se hizo notar previamente (sección 4.3.5), la falta de especificidad en la adsorción de aminoácidos por parte de los materiales usados, implicó que la pérdida de los mismos fuera

Tabla 4.16 Retención de fenilalanina por adsorción en diversos hidrolizados de leche

Hidrolizado	Adsorbente	% de la dosis para eliminar los a.a.	Fen libre en el hidrolizado despues de la adsorción	% de Fen eliminado
A2A-P(*)	C.A. D6R Bx30	100 para eliminar Fen	4.75	82
Pronase (**)	C.A. D6R Bx30	100 para eliminar Fen, Tir y Trp	--	90
A2A-P (**)	C.A. D6R Bx30	125 para eliminar Fen, Tir y Trp	3.34	90
	C.A. V6 10x35	Igual al anterior	3.41	88
	Resina modificada XAD-4	110 para eliminar Fen	13.33	--
HT/Pronase (**)	C.A. D6R Bx30	125 para eliminar Fen, Tir y Trp	2.65	93
HT+Pap/P (**)	C.A. D6R Bx30	Igual al anterior	2.4	93
	C.A. V6 10x35	Igual al anterior	2.5	93

(*) Obtenido bajo las condiciones propuestas por Lara (1988).

(**) Las condiciones de preparación de estos hidrolizados son las presentadas en la Tabla 4.12.

Tabla 4.17 Adsorción de algunos aminoácidos a partir de diversos hidrolizados de leche descremada y con varios adsorbentes.

Hidrolizado	a.a.	(mg del a.a./g de prot.) en solución después del tratamiento		
		C.A. DGR8x30	C.A. VG10x35	XAD-4 modificada
HT-Pap-P	Val	11.2	11.8	N.D.
	Met	6.9	7.7	-
	Ile	9.0	9.5	-
	Leu	44.3	48.2	-
A2A-P	Val	21.6	18.4	13.3
	Met	8.9	8.7	8.3
	Ile	17.7	15.4	11.7
	Leu	62.9	57.2	39.6
HT-P	Val	13.2	N.D.	N.D.
	Met	7.2	-	-
	Ile	9.4	-	-
	Leu	51.2	-	-

Tabla 4.18 Resultado del análisis de hidrolizados de leche descremada después del proceso de adsorción.

A.A.	(mg de a.a./g de proteína) (*)					(1)	(2)
	HT-P-P-M	P-M	HT-P-M	A-P-V	A-P-M		
Asp	31.6	N.D.	27.9	36.6	35.3	33	+
Glu	75.9	-	83.3	108.1	89.5	48	+
Ser	24.1	-	20.2	25.6	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	=

(*) M = carbón activado mineral DGR8x30; V = carbón activado vegetal VG10x35; HT-P-P = HT proteolitic-Papaína-Pronase; HT-P = HT proteolitic-pronase; A-P = Amano 2A-Pronase.

(1) % de retención del aminoácido en carbón activado mineral DGR8x30 (hidrolizado de Amano 2A-Pronase).

(2) Adsorción de carbón activado mineral versus vegetal.

desde un 30% (para aspartato) hasta un 90% para fenilalanina. Globalmente la pérdida de aminoácidos alcanzó un nivel de 50%, lo que hace al proceso poco eficiente en cuanto a productividad. Sin embargo, como se verá más adelante aún así, el proceso resulta económicamente factible.

Por último y como aspecto importante, se observa que al agregar el carbón activado al hidrolizado de leche para efectuar el proceso de adsorción, se forma una solución viscosa (debido quizás a la alta concentración de lactosa). De esta mezcla resulta muy difícil separar el carbón activado por filtración, por lo que se requiere el uso de centrifugación a velocidades mayores a 10000 rpm.

En la Tabla 4.19, se presentan los resultados de la adsorción con carbón activado sobre un hidrolizado de caseína obtenido con las enzimas Amano 2A-Papaína, bajo las condiciones definitivas de hidrólisis (sección 4.4).

Se puede observar de la Tabla 4.19, que el cambio en el sustrato de la reacción de hidrólisis (caseína por leche descremada), 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).

Tabla 4.19 Adsorción de aminoácidos por carbón activado DGR 8x30 sobre hidrolizado de caseína con Amano 2A-Papaína.

Aminoácido	mg a.a./g de proteína		% de pérdida del a.a. en dosis 105%
	105%(*)	85%**)	
Asp	34	N.D.	52
Glu	109	"	50
Ser	35	"	42
His	9	"	69
Gli-Tre	58	"	13
Ala	19	"	38
Arg	4	"	89
Tir	6	"	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.

También es de notar que el uso de una dosis de carbón activado con un 5% de exceso del requerido para eliminar el total de Fen, Tir y Trp, solamente retira un 2% más de fenilalanina,

que si se usara una dosis del 85% de la cantidad necesaria para retirar la suma total de tales aminoácidos. Esta dosis se ensayó, siguiendo las recomendaciones de Hassler(1974), que menciona que para algunos carbones activados, al aumentar la escala de las pruebas disminuye la cantidad de carbón determinada en los ensayos de laboratorio. Sin embargo, en este caso tal fenómeno no se presentó.

Debido a que con la dosis de 5% de exeso de carbón activado, se alcanza el nivel requerido de eliminación de fenilalanina (ver sección 4.6), se definió que se utilizaría ésta como dosis de trabajo. Con esta consideración, la dosis de trabajo para retirar el 92% de la fenilalanina sería de aproximadamente 2.95 gramos de carbón activado por gramo de proteína inicial. Esta dosis es del mismo orden de magnitud que la aplicada en procesos similares (Cogan y col.,1981; Patente japonesa, 1986).

En la Tabla 4.20, se presenta un resumen de las condiciones definidas para la hidrólisis enzimática de caseína y el tratamiento por adsorción para la eliminación de fenilalanina.

Tabla 4.20. Condiciones finales de hidrólisis y adsorción para el proyecto.

Parámetro	Valor
Hidrólisis enzimática	
Sustrato	Caseína
Enzimas	Amano 2A-Papaína
Concentración de sustrato [S] (E/S)	10% 1% - 2%
Temperatura	50°C
Tiempo de reacción	20 horas
Agitación	150 rpm
Recipiente	Cilíndrico sin bafles
Adsorción	
Adsorbente	Carbón activado DGR 8x30
Fabricante	Clarificantes Mexicanos
Forma física	Granular
Dosis	2.95 g de C.A./g de proteína
Agitación	400 rpm
Tiempo de contacto	40 min
Temperatura de operación	20°C

4.6 Características del producto.

Una forma de caracterización del producto desarrollado, puede ser la comparación del patrón de aminoácidos resultante contra el recomendado como ideal por la FAO o bien contra el patrón

presente en los productos comerciales. En la Tabla 4.21, se muestra esta comparación específicamente con respecto a los aminoácidos esenciales.

Tabla 4.21 Comparación del patrón de aminoácidos esenciales en el producto desarrollado contra el recomendado por FAO y el de productos comerciales.

A.A.	% del aminoácido			
	FAO(1973)	Lofenalac(2)	Milupa(2)	Producto desarrollado
His	3.9	3.5	5.1	3.8
Ile	9.7	10.1	12.6	11.1
Leu	22.3	18.8	21.2	23.2
Lis	14.2	20.6	14.8	27.0
Met	5.4(3)	6.6	5.1	4.1
Fen	11.5	1.1	0.0	1.7
Tir	5.8	10.7	12.6	2.6
Tre	12.0	10.5	10.0	12.0
Trp	2.4	2.6	3.7	0.0
Val	12.9	15.5	14.8	14.0
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

- (1) Requerimientos diarios recomendables para un bebé (0-6 meses).
- (2) Valores calculados en base al contenido declarado por los fabricantes.
- (3) Este valor supone que cisteína esta presente en un contenido equivalente al 50% del valor de metionina.

Como se esperaba, el proceso de adsorción de fenilalanina efectuado al hidrolizado de caseína, resulto en la pérdida parcial de His y Met y en la casi total pérdida de Tir y Trp, por lo que para alcanzar el patrón ideal de aminoácidos esenciales deben ser restituidos al producto.

Para que el producto desarrollado tenga un patrón similar al de los productos comerciales éste debiera ser complementado con Tir, Trp, His, Met y Val. En la Tabla 4.22, se puede apreciar el patrón de aminoácidos del producto desarrollado si se complementara con 57 mg de aminoácidos esenciales por 1000 mg de aminoácidos del producto desarrollado. Cabe notar que Tir representa el 50% del total de aminoácidos a suplementar. Los otros aminoácidos representarían 18% el Trp, 15% Val, 11% Met y 6% His.

Tabla 4.22 Patrón de aminoácidos del producto desarrollado posterior a la adición de aminoácidos perdidos en el proceso de adsorción.

A.A.	% del aminoácido			
	Lofenalac	Milupa	Producto(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	28.9
Tre	10.5	10.0	9.7	-
Trp	2.6	3.7	3.5	10.3
Val	15.5	14.8	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 1000 mg de aminoácidos de producto desarrollado

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

De acuerdo a los datos de la Tabla 3.1, el requerimiento de aminoácidos esenciales sería cubierto con un consumo de 2 g de proteína/día por Kg de peso del niño, en forma de proteínas de huevo o leche. El patrón de aminoácidos esenciales del producto complementado (cuarta columna de la Tabla 4.22), sería cubierto teóricamente con 2.56 g del hidrolizado desarrollado y suplementado (una vez seco y con 0% de humedad), lo que en principio representaría un aumento de 25% en el consumo de proteínas respecto a proteínas de alta calidad como son las presentes en el huevo o la leche.

4.7 Formulación del producto

La siguiente etapa en el presente desarrollo, la constituía la comprobación de los resultados obtenidos en el laboratorio a una escala mayor, esto es a nivel planta piloto. Se consideró adecuado el complementar tales experiencias con la formulación de un alimento en base al hidrolizado desarrollado, para la obtención de la información que permitiese proponer un proceso desde materia prima hasta producto terminado.

Se definió la formulación del producto, como la determinación de las relaciones cuantitativas entre los nutrimentos, para la creación de un alimento completo (en teoría) que llenase los requerimientos para el desarrollo adecuado de un niño recién nacido.

Se definió la formulación base para el producto final en términos de las disposiciones de la legislación oficial vigente (Diario Oficial, 1988) y las recomendaciones internacionales (Codex Alimentarius, 1981). La formulación propuesta se presenta en la Tabla 4.23.

Tabla 4.23 Formulación base de un alimento para niños recién nacidos.

Nutrimiento	%
Proteína	23.2
Grasas	23.2
Minerales	3.6
Carbohidratos	50.0
Total:	100.0

Se determinó que una mezcla así preparada representaría aproximadamente 410 Kcal por cada 100 gramos de producto final. En la Tabla 4.24, se listan los materiales seleccionados para cumplir con estas relaciones y que fueron usados durante las pruebas realizadas en planta piloto.

Se definió que el producto final sería presentado como una fórmula en polvo lista para ser usada, por las ventajas que representa un producto sólido y con bajo contenido de humedad en cuanto a conservación, envase, distribución y consumo.

Tabla 4.23 Formulación propuesta del alimento.

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 %

4.8 Pruebas a escala planta piloto

Como era de esperarse las pruebas en planta piloto modificaron en algunos aspectos la forma en que se venía

realizando los hidrolizados de caseína en laboratorio. Además, permitieron detectar los problemas que representa el manejo de lotes grandes. A continuación se detallan las etapas y condiciones de operación determinadas experimentalmente que se requiere efectuar para la obtención del producto final. El tamaño de los lotes que se procesaron fue de 1.5 kg de caseína (15 litros de volumen de reacción).

4.8.1 Hidrólisis enzimática

Se determinó que se requería un recipiente (tanque cilíndrico vertical) con un volumen mínimo de 25 litros, con un sistema de agitación a un mínimo de 400 rpm y sistema de calentamiento (se usó resistencia eléctrica y baño de temperatura controlada).

El volumen del recipiente se definió de tal capacidad ya que al agregar el carbón activado a la solución de hidrolizado, el aumento de volumen podría ser de 30 a 40%.

El recipiente debía de carecer de baffles para permitir un patrón de flujo con vortex, que resultó el más conveniente para la disolución del caseinato en forma rápida (menos de 30 minutos) y más efectivo (por evitar la formación de grumos). La velocidad mínima de 400 rpm se requirió para lograr el patrón de mezclado buscado durante la disolución del caseinato y también para realizar un mezclado eficiente durante el proceso de adsorción, esto es evitar la sedimentación del carbón activado. En rigor, lo que se debió determinar es la potencia suministrada al sistema para hacer una descripción correcta, sin embargo, no se determinaron los parámetros necesarios para tal fin. El número de Reynolds (sección 4.3.2) bajo las condiciones de prueba fue de 3300.

El proceso de hidrólisis se inicia con la adición del agua al tanque (agua destilada), que se calienta hasta la temperatura de trabajo (50°C). Una vez alcanzada la temperatura se procede a agregar el caseinato en forma lenta (evitando la formación de grumos grandes ya que resultan difíciles de disolver). Una vez disuelto el 50% del caseinato se agrega la enzima Amano 2A (tiempo $t=0$) y 5 minutos después se agrega la Papaína. A los 30 minutos de reacción se reanuda la adición de caseinato hasta llegar al 100% (aproximadamente 30 minutos más). Se decidió realizar el proceso de disolución de caseinato de esta forma, ya que para concentraciones por arriba del 7%, la solución adquiere un carácter viscoso que dificulta la disolución del material restante para alcanzar el valor definido de 10% (P/V).

Se determinó que se detendría la hidrólisis a las 20 horas de reacción, que es cuando la concentración de fenilalanina libre en solución alcanza un valor de 16 a 18 mg/g de proteína (aproximadamente 30% de liberación). La solución resultante es opaca, con un color café claro y un fuerte sabor amargo.

El siguiente paso en el proceso lo constituye la desactivación térmica de las enzimas presentes en el hidrolizado. Esto se logra calentando la solución a $T > 90^{\circ}\text{C}$, durante un periodo

de 10 a 15 minutos (Lara,1988). La solución resultante es opaca, de color café claro y en algunas ocasiones presenta una pequeña cantidad de precipitado.

Esta etapa no fue realizada por no contarse con los medios físicos para llevarla a cabo. Sin embargo, se supuso que el no efectuar esta etapa no afectaría el resultado en las etapas posteriores, al menos para el objetivo que se buscaba en estas pruebas.

Una vez terminada la hidrólisis enzimática, se procede a enfriar la solución hasta una temperatura de 20°C.

4.8.2 Adsorción

El proceso de adsorción se inicia con la adición del carbón activado a la solución (en forma continua y rápida), mientras se agita a 400 rpm (la velocidad de agitación la determina el que las partículas no se sedimenten). Se determinó que el tiempo de contacto hidrolizado-carbón fuera de 40 minutos. Una vez transcurrido este período, se permite que el carbón activado sedimente y se separa el líquido de las partículas gruesas de carbón activado. Al final de este proceso se obtiene una solución de color negro.

4.8.3 Separación del carbón activado

La separación del carbón activado suspendido en la solución resultante del proceso de adsorción se llevo a cabo en una centrifuga continua. El tipo de centrifuga usada es del tipo de canasta y para lograr la separación deseada se uso un filtroayuda. El filtroayuda es alimentado previamente al paso de la solución a tratar, con un espesor de aproximadamente 1 centímetro, que se formaba alimentando una lechada con 5 a 10% (P/V). Se determinó que si la capa de filtroayuda no es homogénea, no se logra la total separación del carbón activado. La solución resultante es clara, con una ligera coloración amarilla y un contenido de sólidos de 4.5% (P/P) aproximadamente. En esta solución el sabor amargo es nulo.

4.8.4 Formulación del alimento

Si nos referimos a la formulación propuesta nos encontramos que hay que mezclar componentes insolubles entre sí (p.ej., aminoácidos con grasa). Una manera de integrar grasa a los elementos de la mezcla es por medio de la formación de una emulsión. Otra opción la constituye la microencapsulación de las grasas. Se determinó que las grasas serían emulsificadas en la solución resultante del proceso de adsorción. Se determinó que los materiales restantes de la formulación se mezclarían en seco para evitar reacciones indeseables durante el secado (p.ej., reacción de Millard entre aminoácidos y carbohidratos).

La emulsificación se logró usando monoestearato de glicerilo y lecitina como emulsificantes y algarrobo como espesante.

Debido a la falta de equipo de emulsificación adecuado, se usaron homogenizadoras de 2.5 litros de capacidad.

Para poder llevar a cabo la emulsificación se requiere que todos los componentes de la misma sean calentados previamente a una temperatura no menor de 50°C. Primeramente se disuelve el algarrobo en el hidrolizado y a continuación se agrega el monoestearato (fundido). Inmediatamente se adicionan las grasas en forma simultánea. Por último se agrega la lecitina a la solución. Todos los componentes se adicionan mientras se agita vigorosamente. La solución resultante es opaca, de color blanco de aspecto parecido a leche y de olor agradable (por la adición de la grasa de leche).

La efectividad del proceso y estabilidad de la emulsión se detecta fácilmente por la ausencia de partículas de grasa. Esta emulsión es estable a temperatura ambiente aun por períodos de hasta 4 horas. Si se refrigera se forma una capa con aspecto a crema. El contenido de sólidos de esta solución es de aproximadamente 9% (P/P).

4.8.5 Secado

Se intentó secar al producto emulsificado por el método de asperción. Sin embargo, no se lograron determinar las condiciones para tener un contenido de humedad menor a 9%. Los parámetros que se variaron en estas pruebas fueron el tamaño de partícula, velocidad del aire en la cámara y temperatura. Por las características del equipo, la única medición cuantitativa fue la de temperatura. Los rangos de temperatura manejados fueron, a la entrada de la cámara, de 140 a 150°C y de 75 a 100°C a la salida de la misma. El producto obtenido es un polvo blanco, ligeramente amarillo y de consistencia semejante a la leche en polvo, con un olor y sabor característico.

4.8.6 Formulación final

Se mezclaron los carbohidratos, las sales y el producto de secado, obteniéndose un polvo blanco con aspecto a leche en polvo. En la Tabla 4.25, se resumen las proporciones de componentes para la obtención del producto final.

El material resultó de fácil disolución en agua a temperatura ambiente. La solución obtenida es de color blanco (sin llegar a ser tan opaca como la leche), la cual es estable a temperatura ambiente sin notarse separación de fases (destrucción de la emulsión) y sin sedimentos.

4.8.7 Envasado

Se sometieron muestras del producto resultante a diversas condiciones de envase, determinándose que la mejor forma de conservación (determinada únicamente por ausencia de olores, p.ej., rancidez), se obtenía cuando se envasaba en un frasco protegido de la luz y bajo atmósfera de nitrógeno, si la humedad del producto era mayor a 5% y sin atmósfera de nitrógeno si el producto contenía humedad menor o igual a 3%. El producto resulta estable hasta por un periodo de 2 meses.

Tabla 4.25 Proporciones de componentes en el producto final

Componente	%
Hidrolizado bajo en Fen (1)	23.20
Grasa de leche	14.85
Aceite de maíz	7.42
Monoestearato de glicerilo	0.46
Lecitina	0.46
Algarrobo (2)	0.75
Maltodextrina	50.00
Minerales	2.95
Vitaminas	0.07
Total:	100.16

(1) Este valor no considera que se debe complementar el hidrolizado con los aminoácidos perdidos durante el proceso de adsorción.

(2) Codex Alimentarius (1981), establece un límite de 0.032 gramos de algarrobo por gramo de proteína.

4.9 Evaluación económica preliminar

Al nivel actual de desarrollo del producto y del proceso, sería poco útil y práctico intentar realizar una evaluación económica profunda del costo de producción.

Sin embargo, se podría obtener un estimado del costo probable del producto terminado, tomando en cuenta el costo de las materias primas y asignando un costo al proceso de producción. Este costo se estableció como 50% del costo de las materias primas (Aries, 1955). En la Tabla 4.26, se presenta el estimado del costo probable del producto desarrollado, en base al costo de adquisición de las materias primas usadas durante las pruebas en planta piloto.

Si comparamos el costo obtenido de 35300 pesos por kilogramo de producto terminado, contra el costo de 34,600 pesos por kilogramo de Lofenalac puesto en Estados Unidos (Anónimo, 1986b), se podría considerar que en principio, el producto desarrollado sería competitivo en costo con el producto comercial de características similares al presentado en esta tesis. Nótese que el precio del producto Lofenalac es del año de 1986 y los precios de la materia prima utilizada son de enero de 1989 (costo de adquisición al menudeo). Adicionalmente, en esta comparación no se incluyen los costos de importación del producto, que en la práctica han resultado elevados, independientemente de los trámites requeridos.

Tabla 4.26 Costo probable de producción del alimento desarrollado (en base al procesamiento de 10 kg de caseína).

<u>Materia Prima</u>	<u>Cantidad</u>	<u>Costo Unitario</u> (1)	<u>Costo (pesos)</u> (2)
Caseína	10 kg	\$15,000/kg	150,000
Proteasa	100 g	\$100 US/kg	25,000
Papaína	200 g	\$ 50 US/kg	25,000
Triptófano	47 g	\$ 63 US/kg	7,400
Tirosina	130 g	\$ 43 US/kg	13,975
Histidina	15 g	\$ 60 US/kg	2,250
Metionina	28 g	\$ 33 US/kg	2,310
Valina	37 g	\$ 40 US/kg	2,700
Grasa butírica	2880 g	\$ 6,000/kg	17,280
Aceite de Maíz	1440 g	\$ 2,800/kg	4,032
Sólidos de Maíz	9698 g	\$ 1,295/kg	12,559
Carbón activado	29.5 kg	\$ 6,000/kg	177,000
Subtotal: \$439,521			
+ 5% otros (3): \$ 21,976			
Total materia prima: \$461,497			

Rendimiento de producto:			20 kg
Costo de Materia prima por kg de producto:			\$ 23,075
Costo de empaque por Kg (4) :			\$ 500

Subtotal: \$ 23,575			
+ 50% costo de producción: \$ 11,787			

Costo probable por kg de producto terminado:			\$ 35,362
=====			

(1) Datos a enero de 1989.

(2) 2500 pesos por dólar.

(3) Emulsificantes, espesante, minerales, vitaminas y agua de proceso.

(4) Bolsa de aluminio-polietileno.

4.10 Proceso propuesto

El procesamiento del alimento bajo en fenilalanina podría llevarse a cabo en las instalaciones de plantas existentes (p.ej., LICONSA) o bien construirse instalaciones nuevas. Debido a la baja demanda del producto, la primera opción resultaría la más adecuada.

A continuación se presentan las actividades a realizar para la adaptación del proceso propuesto para la producción del alimento en las instalaciones de una planta existente.

4.10.1 Pronóstico de demanda del producto

El pronóstico de demanda del producto se presenta en la Tabla 4.27 (ver Anexo I).

Tabla 4.27 Pronóstico de demanda de 1990-1997 (ver Anexo I)

Producto	Pronóstico (kg/año)				
	1990	1991	1992	1993	1997
Alimento bajo en fenilalanina	3300	9540	15780	22020	46980

4.10.2 Estado actual de desarrollo de la tecnología

Se cuenta actualmente con la tecnología desarrollada. La ingeniería básica del proceso deberá completarse para definir las condiciones de emulsificación y de secado. Adicionalmente se deberá desarrollar toda la ingeniería de detalle del proceso.

Por último, se deberá definir la institución en la cual se llevara a cabo la maquila del producto.

4.10.3 Definición de capacidad de producción

En la Tabla 4.28, se presenta el cálculo de lotes que sería necesario producir para cumplir con el pronóstico de demanda para el producto propuesto (en base a los rendimientos obtenidos en las experiencias de planta piloto). En este cálculo se supone que no cambia la capacidad inicial de producción (p.ej., por alguna ampliación en las capacidad de las instalaciones).

En vista de lo presentado en la Tabla 4.28, parecería adecuado que las instalaciones seleccionadas contaran con un tanque de al menos 14000 litros de volumen efectivo de operación

(10000 litros más 40% por aumento de volumen en la adsorción), con el fin de que la producción del alimento no utilizara más del 10% del tiempo disponible de operación anual (al octavo año).

Tabla 4.28 Número de lotes a producir para cumplir con la demanda probable en función de la capacidad del tanque de reacción.

Volumen de reacción (litros)	Número de lotes por año		% de ocupación (1)
	Primer año	Octavo año	
1000	17	242	84
2000	8	121	42
5000	3	48	15
10000	1.7	24	8

(1) Por ciento de ocupación del tiempo de producción de una planta, considerando 48 semanas al año, 6 días laborables por semana y 2 días para producir un lote.

4.10.4 Instalaciones requeridas

Los equipos y sistemas con que deberá contar la planta para la manufactura del producto serían (en principio), los siguientes:

- Tanque cilíndrico vertical, enchaquetado, sin bafles, y con sistema de agitación.
- Tolvas de dosificación de materias primas (caseinato, enzimas, carbón activado).
- Centrifuga continua.
- Equipo de emulsificación (incluyendo equipo anexo).
- Secador por asperción (con tolva de producto terminado).
- Mezclador de sólidos.
- Empacadora semiautomática.
- Bodega de materias primas y producto terminado.
- Cuarto frío.
- Equipo de laboratorio para llevar a cabo el control de calidad de las materias primas y producto terminado.

Tales equipos deberán cumplir (como mínimo) con las características de operación requeridas por el proceso (sección 4.2).

4.10.5 Materias primas

Las materias primas requeridas para maquilar 1000 kg de caseinato se presentan en la Tabla 4.29. El procesamiento de un lote de esta magnitud resultaría en 2000 kg de producto terminado.

Tabla 4.29 Requerimientos de materia prima para maquilar 1000 kg de caseinato.

Materia prima	kilogramos
Caseinato de sodio	1000
Maltodextrina	970
Grasa butírica	290
Aceite de maíz	145
Algarrobo	14.5
Monoestearato de glicerilo	9
Lecitina	9
Minerales (sales grado alimenticio)	57
Vitaminas (premezcla comercial)	1.5
Carbón activado	2950

4.10.6 Producto

Se obtendría un producto único definido como alimento bajo en fenilalanina y formulado con los nutrimentos necesarios para permitir un desarrollo completo de niños fenilcetonúricos.

4.10.7 Calidad

El producto deberá cumplir con la Norma Oficial Mexicana respectiva (Alimentos para Lactantes y Niños; Diario Oficial, 1988). Además deberá tener un contenido máximo de fenilalanina por unidad de peso de producto terminado de acuerdo a los requerimientos del Programa Nacional de Prevención del Retraso Mental.

4.10.8 Rendimiento

El rendimiento del proceso se estima de 45% hasta la etapa de separación del hidrolizado-adsorbente y de un 95% de la etapa de emulsificación hasta la etapa de envasado.

4.10.9 Requerimientos de personal

Para llevar a cabo las diversas actividades del proceso, se estima que se requeriría de un operador y un ayudante en tres turnos durante dos días, para la preparación de un lote de alimento.

Sería necesario también un supervisor de producción que coordine todas las actividades del proceso y sea responsable de la producción, calidad y mantenimiento de las instalaciones.

4.10.10 Manejo de materiales

- Materias primas

Los materiales estables a temperatura ambiente, serían almacenados en bodega dentro de su empaque original (caseinato, maltodextrina, sales, grasa butírica, espesante, monoestearato, carbón activado).

Los materiales susceptibles a degradación a temperatura ambiente, deberán ser almacenados en cuarto frío (aceite de maíz, enzimas, vitaminas, lecitina).

- Producto

Todo el producto debería ser envasado al final del proceso de producción. Podría ser envasado en bolsas de aluminio-polietileno de 1 kg de capacidad. Para su manejo, almacenamiento y distribución, podrían empacarse en cajas de cartón.

4.10.11 Desechos y su control

El proceso de producción de este tipo de alimentos, genera los siguientes desechos:

- Carbón activado con hidrolizado de caseinato adsorbido.
- Filtroayuda usado.
- Lotes de hidrolizado perdidos.
- Agua de lavado de equipos con residuos de producto y sanitizantes.

Sería necesario consultar la legislación vigente al respecto, para determinar la ruta de eliminación de tales desechos o bien su pretratamiento antes de su eliminación.

A la fecha no se ha definido si sería económico recuperar el hidrolizado adsorbido en el carbón activado y, si resulta económico la regeneración del carbón activado para su reciclado al proceso.

4.10.12 Servicios requeridos

Los principales servicios de planta requeridos por el proceso serían:

- Vapor de calentamiento
- Electricidad
- Agua de proceso (habría que definir la calidad de agua a usarse en la producción del alimento)
- Agua de planta
- Agua de enfriamiento

4.10.13 Diagrama de flujo

En la Figura 4.9, se presenta el diagrama de flujo del proceso propuesto, en el que se incluyen las principales operaciones y corrientes de materiales de que está formado.

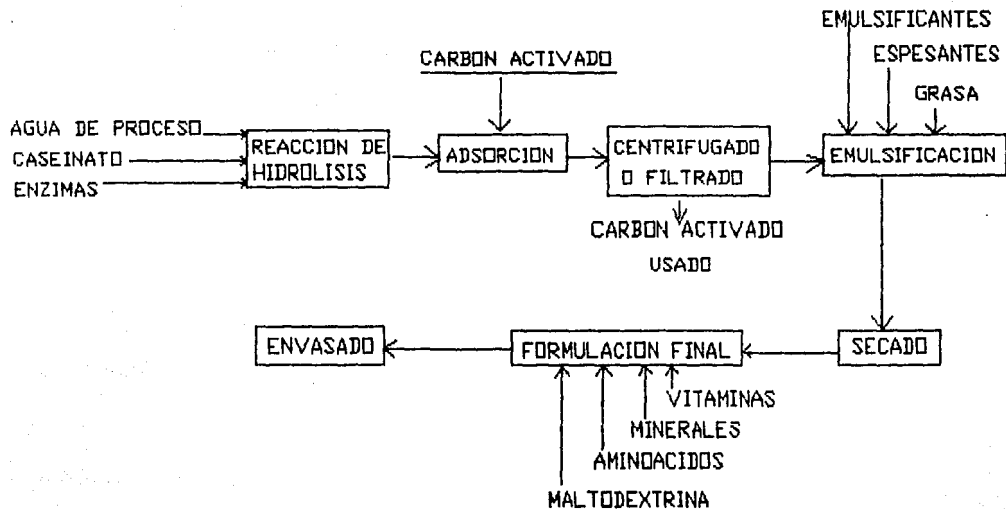


FIGURA 4.9 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO PROPUESTO.

Conclusiones

* Se encontró por razones técnicas y económicas que la caseína era la materia prima más adecuada para la producción de un alimento bajo en fenilalanina.

* Se desarrolló un proceso enzimático con el fin de hidrolizar la proteína y hacer factible la separación de la fenilalanina.

* Se seleccionó el material (carbón activado) y se establecieron las condiciones para efectuar un proceso de adsorción del aminoácido en la forma más selectiva posible.

* El producto desarrollado presenta un perfil de aminoácidos adecuado y contiene niveles de fenilalanina que le permiten ser empleado en las dietas de fenilcetonúricos.

* Se formuló un alimento con la fuente de proteína baja en fenilalanina y los nutrimentos necesarios para un desarrollo adecuado de lactantes fenilcetonúricos.

* Se estudiaron los procesos de estabilización, homogenización y condiciones para el secado del producto.

* El costo del producto con el desarrollo efectuado resulta ser similar al del producto comercial norteamericano puesto en Estados Unidos.

* Se deberá optimizar la etapa de adsorción para aumentar el rendimiento de recuperación de hidrolizado de proteína.

* Se deberá definir un proceso económico de regeneración del carbón activado para que pueda ser reciclado al proceso, con el fin de disminuir los costos de producción del alimento propuesto.

* Se deberán continuar los estudios de ingeniería para definir las condiciones de emulsificación, secado y adaptación del proceso de producción a las instalaciones de alguna institución pública o privada.

* Se deberán realizar los estudios biológicos que permitan asegurar que el producto propuesto, permitirá un sano desarrollo de los niños fenilcetonúricos.

REFERENCIAS

- Acosta, P.B.; Wenz, E. (1977) Diet Managment of PKU, US Dept. of Health Education and Welfare.
- Adams, R. (1979) Laboratory experiments in Organic Chemistry, 7th. Ed., Mc Millan Pub. Co., Nueva York.
- Adamson, A.W. (1976a) Physical Chemistry of Surfaces, 3th. Ed., Wiley, USA, 575-577.
- Ibid (1976b), 389.
- Adler-Nissen, J. (1986) Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, Elsevier, Gran Bretaña, Cap. 1-5.
- Algliesh, C.E. (1956) Adv. Protein Chem., 10, 31-130.
- Altschul, A.M. (1974) Nature, 248, 643.
- Anderson, P.A. (1977) Encyclopedia of Chemical Processing and Desing, Marcel Dekker, Vol. 2, 174-213.
- Anónimo (1976) Pediatrics, 57, 783-791.
- Anónimo (1980) Medical Foods, Reference Manual, Milupa Corporation, Product Monograph, 1-67.
- Anónimo (1981) Ion Exchange and Polymeric Adsorption Technology in Medicine, Nutrition and the Pharmaceutical Industry, Rohm and Hass Company, USA.
- Anónimo (1986) Pediatric Products Handbook, 1986 Edition, Mead Johnson Nutritional Division, USA, 27-31.
- Anónimo (1986b) Mead Johnson Nutritional Division, USA, Price List.
- Anónimo (1988) Especificaciones Técnicas de Carbones Activados, Clarimex S.A. de C.V., México.
- AOAC (1975) Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 11th Ed., Washington, D.C.
- Aries, R.S., Newton, R.D. (1955) Chemical Engineering Cost Estimation, McGraw Hill, Cap. 4 y 9.
- Armstrong, M.D., Tyler, F.M. (1955) J. Clin. Invest., 34, 565.
- Berry, H.K., Sutherland, B.S., Hunt, M.M., Fogelson, M.M., O'Gardy, D. (1976) Am. J. Clin. Nutr., 29, 351-357.
- Bickel, H.; Gerrard, J., Hickman, E.M. (1953) Lancet, 2, 812.

- Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans, E.M. (1954) Acta Paediat., 43, 64.
- Bickel, H., Schmidt, H., Schurle, L. (1973) Bibl. Nutr. Dieta, 18, 181-201.
- Bickel, H. (1979) Curr. Concepts Nutr., 8, 35-53.
- Bickel, H. (1980) J. Inher. Metab. Dis., 3, 123-132.
- Casassa, E.F., Eisenberg, H. (1965) Adv. Protein Chem., 20, 287-288.
- Cederbaum, S.D. (1984) Genetic Factors in Nutrition, Academic Press, 79-91.
- Cheldelin, V.H., Williams, R.J. (1942) J. Am. Chem. Soc., 64, 1513.
- Codex Alimentarius (1981) Codex Standard for Infant Formula, Codex Stan. 72-1981, Part II.
- Cogan, U., Moshe, M., Mokady, S. (1981) J. Sci. Food Agric., 32, 459-466.
- Dalglish, C.E. (1956) Adv. Protein Chem., 10, 33-35.
- Darsley, R.R., Quesnel, V.C. (1972) J. Sci. Food Agric., 23(20), 215-225.
- Darylo-Marczewska, A., Jaroniec, M., Oscik, J., Marczewski, A.W. (1985) Chem. Eng. Sci., 40(6), 917.
- Davidson, S. (1979) Human Nutrition and Dietetics, Churchill Livingstone, Londres, 316.
- Diario Oficial de la Federación (1988) Alimentos para lactantes y niños de corta edad, Primera sección, Título décimo primero, Cap. I, Fórmula para Lactantes, Art. 733, Lunes 18 de Enero de 1988, 82-84.
- Dudar, J. (1975) Physics and Chemistry of Surfaces, Blackie & Sons Inc., Inglaterra, 30-39.
- Eriksen, S., Fegerson, I.S. (1976), Flavours, Enero-Febrero, 13-16.
- Evans, C.T. Choma, C., Misawa, M. (1987) Enzyme Microb. Technol., 9(9), 542-545.
- FAO (1970) Contenido de aminoácidos en alimentos y datos biológicos de proteínas, FAO, Roma.
- FAO (1973) Energy and protein requirements, Reporte conjunto FAO/WHO, World Health Organization, Techn. Rep. Ser. 522, WHO (citado por Fennema, 1986).

- Fennema, O.R. (1986) Food Chemistry, 2nd. Ed., Marcel Dekker, USA, Cap. 5.
- Fox, P.F. (1980) en Proteinases and Their Inhibitors, Turk,V. (Ed.),Pergamon Press, 245-267.
- Greenbug, N.A., Shipe, W.F. (1979) J. Food Sci., 176,367-369.
- Greenstein, J.P., Winitz., M. (1961) Chemistry of Aminoacids, Wiley, USA, Cap. 34.
- Grizzle, P., Thomson, J.S. (1982) Anal. Chem., 54, 1071-1078.
- Groggins, P.H. (1957) Unit Processes in Organic Synthesis, McGraw Hil, USA, Cap. 1.
- Harper, W.J., Hall, C.W. (1981) Dairy Technology and Engineering, AVI Pub. Co., USA, Cap. 2, 3 y 13.
- Harris, R.S., Karmas, E. (1977) Nutritional Evaluation of Food Processing, Wiley, USA, Sec. 4.
- Hassler, J.W. (1974) Purification with Activated Carbon, Chemical Pub. Co., USA.
- Helbig, N.B., Ho, L., Christy, G.E., Nakai, S. (1980) J. Food Sci., 45, 331.
- Hill, R.L. (1965) Adv. Protein Chem., 20, 37-107.
- Kopple, K.D. (1966) Peptides and Aminoacids, Benjamin, USA, Cap. 2.
- Lalasidis, G., Sjoberg, L. (1978) J. Agric. Food Chem., 26, 742.
- Lara, P.C. (1988) Tesis Maestria en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México.
- Lawrence, L., Moore, W.J. (1951) J. Am. Chem. Soc., 73, 3973.
- Lenhinger, A.L. (1986) Bioquímica, Ed. Omega, España; 542; 100 y 173; 536-538; 544-545.
- Lugat, F.M. (1985) Lait et Produits Laitiers, Lavoisier Tec & Doc, Francia, Vol. 1, Cap. 1.
- Ma, C.Y., Anantea, G.F., Nakai, S. (1983) J. Food Sci., 48, 897.
- McCaman, M.V., Robbins, S.E. (1962) J. Lab. Clin. Meth., 59, 885.

- Manz, F., Schmidh, H., Schärer, K., Bickel, H. (1977) *Pediatr. Res.*, 11, 1084.
- Meister, A. (1965) *Biochemistry of Aminoacids*, Academic Press, USA.
- Meriwether, L. Westheiner, F.H. (1956) *J. Am. Chem. Soc.*, 78, 5119.
- Moore, S.G., Stein, W.H. (1948) *J. Biol. Chem.*, 176, 367.
- Murray, T.K., Baker, B.E. (1952) *J. Sci. Food Agric.*, 3, 470.
- Nayman, R., Thomson, M.E., Scriver, C.R., Clow, C.L. (1979) *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 1279-1289.
- Okamoto, M., Yamada, F. (1984) *J. Chromatogr.*, 283, 61-76.
- Pachter, K. (1951) *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 4958.
- Parker, C.E., Shaw, K.N.F., Mitchell, J.S., Koch, R., Wonz, E., Fishler, K. (1977) *J. Pediatr.*, 91, 941-943.
- Patente Japonesa (1986) JP 84192000 (Fuente World Patent Index).
- Perry, R.H., Chilton, C.H. (1973) *Chemical Engineers' Handbook*, 5th Ed., McGraw Hill, 19-6 a 19-8.
- Porath, J. (1984) *J. Chromatogr.*, 159, 13-24.
- Richardson, T. (1977) *Adv. Chem. S., A.C.S.*, No. 160, Cap. 7.
- Roland, J.F., Mattis, D.L., Kiang, S., Alm, W.L. (1978) *J. Food Sci.*, 45(5), 1491.
- Saijo, R., Takeo, T. (1970) *Agric. Biol. Chem.*, 34(2), 22-26.
- Satterlee, L.D., Chang, K.C. (1981) *Food Development*, 11, 50-53.
- Schramm, G., Primosigh, J. (1943) *Ber.*, 76, 373.
- Scriver, C.R., Clow, C.L. (1980a) *N. Engl. J. Med.*, 303(23), 1336-1349.
- Scriver, C.R., Clow, C.L. (1980b) *N. Engl. J. Med.*, 303(24), 1394-1400.
- Sircar, S., Myers, A.L. (1971) *AICHE J.*, 17(1), 186.
- Smith, I., Francis, D.E.M., Clayton, B.E., Wolff, O.H., (1975) *Arch. Dis. Child.*, 50, 864-870.

- Smith, J.M. (1968) Adv. Chem. S., A.C.S., No. 79, Cap. 2.
- Smith, J.M. (1981) Chemical Engineering Kinetics, McGraw Hill, USA, 310-314.
- Snell, Snell (1956) Colorimetric Methods of Analysis, Vol. 4, Van Nostrand Co.
- Sullivan, J.J., Jazo, G.R. (1972) Aust. J. Dairy Technol., 27, 98.
- Tiselius, A. (1941) Arkiu Kemi, Mineral, Geol., 15B, No. 6.
- Tiselius, A. (1947) Adv. Protein Chem., 3, 67.
- Thomas, W.L., Lombardi, J.L. (1971) Trans. Instn. Chem. Eng., 49, 240.
- Thomas, W.L., Qureshi, A.R. (1971) Trans. Instn. Chem. Eng., 49, 60.
- Toudeur, D., Lancrenon, X. (1977) L'échange d'ions dans l'industrie alimentaire, ENSIA, Francia, 3-5.
- Valenzuela, R.H. (1975) Tratado de Pediatría, Ed. Interamericana, México, 91-92.
- Velázquez, A.A. (1987) Cuadernos de Nutrición, 10(3), 17-32.
- Vermeulen, T. (1958) Adv. Chem. Eng., 2, 147.
- Wetlaufer, D.B. (1962) Adv. Prot. Chem., 17, 303.
- Whitaker, J.R. (1972) Principles of Enzymology for the Food Sciences, Marcel Dekker, Cap. 19.
- Yamashita, M., Akai, S., Fujimaki, M. (1976) J. Food Sci., 41, 1029.

Anexo I. Pronóstico de demanda del alimento bajo en fenilalanina

Se estima que serán detectados 150 casos anuales y que tales casos deberán ser tratados con una dieta especial basada en un producto bajo en fenilalanina durante los primeros ocho años de vida.

La FAO (1973), establece un requerimiento diario de aminoácidos esenciales de 742 mg/día por kg de peso para bebés de 0 a 6 meses de edad. Se estableció (sección 4.6), que tal cantidad de aminoácidos estaría teóricamente incluida en 2.56 g del hidrolizado complementado que se propone en el presente desarrollo. De acuerdo a la formulación propuesta (Tabla 4.25), la proteína en el alimento final representa el 23.2%, por lo que se requerirían de 11.0 gramos del mismo para cumplir con el requerimiento de aminoácidos esenciales por día por kilogramo de peso del niño.

En promedio el peso de niños mexicanos al nacer es de 3.3 kg y al año este peso se triplica, esto es 9.0 kg (Valenzuela, 1975). Si tomamos el promedio entre estos dos valores como el peso de un niño durante el primer año de vida, se tendría un peso de 6.15 kg (en realidad el peso promedio es de 7.8 kg).

Si consideramos que los niños fenilcetonúricos siempre están por abajo del percentil 3, lo que representa aproximadamente un 10% menos en peso, entonces el peso promedio sería de 5.5 kg.

Por lo tanto el requerimiento de alimento durante el primer año sería:

(11 g de alimento/día por kg por niño) (5.5 kg)

= 60.5 g de alimento/día por niño

(60.5 g/día) (365 días/año) = 22000 g de alimento/año por niño

(22000 g/año por niño) (150 niños) =

Consumo el primer año = 3300 kg de alimento/año

La FAO (1973), recomienda que a los 10 años de edad un niño debe consumir 261 mg de aminoácidos esenciales por día por kilogramo de peso. El promedio entre 1 y 10 años sería de 500 mg/día por kg. Para cumplir con tal requerimiento se debería consumir 1.77 g de hidrolizado, lo que representaría 7.6 gramos de alimento formulado.

El peso de niños mexicanos a los 8 años es en promedio de 26.11 kg y a los cuatro años de 16.73 (el promedio de peso entre 1 y 8 años sería de 17.6).

Por lo tanto, para niños de 1 a 8 años se tendría el siguiente consumo anual:

Consumo diario = $(7.6)(16.73 \times 0.9) = 114$ g de alimento/día por niño

Consumo anual = $(114)(365) = 41600$ g de alimento/año por niño

Consumo total = $(41600)(150) = \underline{6240}$ kg de alimento/año

Por lo tanto, el consumo de alimento en el segundo año del programa sería de 9540 kg $[3300 + 6250]$. Al tercer año sería de 15780 kg $[3300 + 2(6250)]$. Al cuarto año de 22020 kg y al octavo año llegaría a 46980 kg de alimento por año.

En esta estimación no se toma en cuenta que no todos los niños fenilcetonúricos serán tratados con un alimento de esta clase, que en los últimos años del tratamiento no toda la proteína ingerida proviene de un alimento como el propuesto y las muertes.