

00567

1  
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN ALIMENTO BAJO EN FENILALANINA

I. HIDROLISIS ENZIMATICA DE PROTEINAS

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIA DE ALIMENTOS

(QUIMICA DE ALIMENTOS)

PRESENTA LA :

BIOL. Paulina Lara Calderón

MEXICO D.F.

1990

TESIS CON  
PALLA DE ORIGEN



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

Abreviaturas .....	1
I. Introducción .....	3
II. Objetivos .....	15
III. Generalidades .....	18
1. Hidrólisis enzimática de proteínas .....	18
2. Clasificación de proteasas .....	21
3. Cinética .....	22
4. Problemas de sabor .....	35
5. Procesos propuestos para la elaboración de alimentos bajos en fenilalanina .....	41
6. Disponibilidad de enzimas .....	42
7. Alternativas de materia prima .....	44
IV. Materiales y métodos .....	49
V. Resultados y discusiones .....	59
Selección de la materia prima .....	59
Caracterización de la leche en polvo descremada .....	60
Correlación entre los métodos de microkieldhal y Anson para evaluar el desarrollo de la hidrólisis .....	61
Selección de enzimas .....	64
Determinación de la actividad enzimática .....	64
Concentración de sustrato .....	69
Hidrólisis de proteínas por diferentes proteasas .....	70
Determinación por fluorometría de la fenilalanina libre .....	73
Inactivación de la enzima Amano-2A .....	75
Experimentos de Hidrólisis con mezcla de proteasas .....	78
Optimización de la hidrólisis de proteínas con la proteasa Amano-2A .....	90
Experimentos de hidrólisis con las proteasas	

Amano-2A y pronasa en un proceso de dos etapas .....	101
Conclusiones .....	106
Bibliografía .....	109

## INDICE DE TABLAS

### TABLA No.

1. composición de algunos sustitutos para proteínas .....	10
2. Ejemplos de enzimas proteolíticas empleadas en la industria de alimentos .....	23
3. Proteasas disponibles de uso potencial en la elaboración de alimentos bajos en fenilalanina .....	43
4. Evolución de los precios de diversos productos proteínicos empleados en la industria .....	47
5. Composición de aminoácidos de las materias primas propuestas para el proceso .....	48
6. Análisis bromatológico de la LFD .....	61
7. Correlación entre los métodos de Anson y de Kjeldhal para evaluar el desarrollo de la hidrólisis .....	63
8. Vi. actividad específica y unidades de actividad de las proteasas HT, papaina, Amano-2A y N .....	69
9. Hidrólisis de proteínas con diferentes proteasas .....	72
10. Caracterización de las enzimas proteolíticas en términos de liberación de tirosina .....	73
11. Determinación por fluorometría de la fenilalanina Amino libre .....	75
12. Hidrólisis de proteínas con mezclas de proteasas .....	79
13. Fenilalanina Amino libre obtenida en hidrólisis con mezcla de proteasas .....	81
14. Caracterización de las mezclas de enzimas en términos de liberación de tirosina .....	87

15. Cuantificación de aminoácidos libres obtenidos en hidrolizados de LPD con diferentes tratamientos proteolíticos .....	88
16. Caracterización de las mezclas de proteasas en términos de la liberación de fenilalanina .....	89
17. Cuantificación de aminoácidos totales en la LPD .....	90
18. Hidrólisis de proteínas a diferentes concentraciones de Amano-2A .....	94
19. Efecto de la dosis de pronasa en la liberación de fenilalanina .....	104

## INDICE DE FIGURAS

### FIGURA No.

1. Metabolismo parcial de la tirosina .....	4
2. Metabolismo de la fenilalanina .....	6
3. Estructura de la lantionina, lisinoalanina y $\beta$ -Aminoalanina .....	12
4. Correlación entre el método de microkjedhal y el método de Anson para evaluar el desarrollo de la hidrólisis .....	62
5. Velocidad inicial de la papaina .....	65
6. Velocidad inicial de HT-Proteolytic 200 .....	66
7. Velocidad inicial de Amano-2A .....	67
8. Velocidad inicial de proteasa N .....	68
9. Evolución de la hidrólisis de proteínas de la leche con diferentes proteasas .....	71
10. Correlación entre la NH <sub>2</sub> -fen libre y la tirosina liberada durante 5 horas de hidrólisis con Amano-2A .....	76
11. Inactivación de Amano-2A .....	77
12. Hidrólisis de proteínas de la leche con mezclas de proteasas .....	80
13. Cromatograma de los estándares de aminoácidos derivatizados .....	83
14. Cromatograma de un hidrolizado de LPD con Amano-2A .....	84
15. Cromatograma de un hidrolizado de LPD con la mezcla de Amano-2A / HT .....	85
16. Cromatograma de un hidrolizado de LPD con la mezcla de Amano-2A / papaina .....	85

17. Cromatograma de un hidrolizado de LPD con la mezcla de Amano-2A / proteasa N .....	86
18. Desarrollo de la hidrólisis de las proteínas de la leche con diferentes concentraciones de Amano-2A .....	91
19. $V_i$ Obtenida en función de la concentración de la enzima Amano-2A .....	93
20. Efecto de la temperatura en la evolución de la hidrólisis de las proteínas de la leche con Amano-2A .....	95
21. Efecto de la temperatura de reacción en la $V_i$ de Amano-2A .....	96
22. Gráfica de Arrhenius para la determinación de la energía de activación en la reacción catalizada por la enzima Amano-2A .....	98
23. Efecto de la concentración de sustrato en la $V_i$ de Amano-2A .....	99
24. Cambio en la $V_i$ de Amano-2A en función de la concentración de sustrato .....	100
25. Gráfica doblemente reciproca de $1/V_i$ en función de $1/[S]$ de la hidrólisis catalizada por la enzima Amano-2A .....	102



## ABREVIATURAS

Aa	aminoácido
ABFA	alimentos bajos en fenilalanina
ADMI	American Dry Milk Institute
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATCA	ácido triclorobacético
AU	unidades Anson
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
CPF	concentrado de proteínas de pescado
CPB	concentrado de proteína de suero
CSPP	concentrado soluble de proteína de pescado
E/S	relación enzima/sustrato
FAO	Food and Agriculture Organization
FCU	fenilcetonuria
FEN	fenilalanina
°C	grado centigrado
GH	grado de hidrólisis
HFB	hidrofóbico
HPLC	High Performance Liquid Chromatographic
HPP	hidrolizado de proteína de pescado
HT	enzima HT-proteolytic 200
K <sub>m</sub>	constante de Michaelis

LFD	leche en polvo descremada
N.D.	no determinado
NU	unidades Northrop
T	temperatura
t	tiempo
TIR	tirosina
$V_i$	velocidad inicial
$V_{max}$	velocidad máxima.

## I. INTRODUCCION .

La fenilcetonuria es un error innato del metabolismo de la fenilalanina en la especie humana, en el cual este aminoácido no puede ser convertido a tirosina.

La fenilalanina es un aminoácido indispensable que se requiere en la síntesis de proteínas, sobre todo en el período de crecimiento rápido de la primera infancia. La fenilalanina se convierte en tirosina en el primer paso de su metabolismo. La tirosina formada se oxida posteriormente para formar el ácido homogentísico y finalmente dióxido de carbono y agua. La tirosina también se metaboliza a dopamina, a epinefrina a norepinefrina, a tiroxina y a melanina ( fig 1 ). En los mamíferos, la hidroxilación de la fenilalanina ocurre principalmente en el riñon y en el pancreas.

La fenilalanina hidroxilasa del hígado de los mamíferos requiere de oxígeno, de NADH y BH<sub>4</sub> y es específica para la L-fenilalanina. Contiene una fracción estable distribuida ampliamente por todos los tejidos y una fracción lábil, que se encuentra únicamente en el hígado. Este factor lábil, es la enzima que cataliza la hidroxilación de la fenilalanina y una deficiencia en su actividad es lo que ocasiona la fenilcetonuria (1) . Esta alteración lleva a la acumulación de fenilalanina en

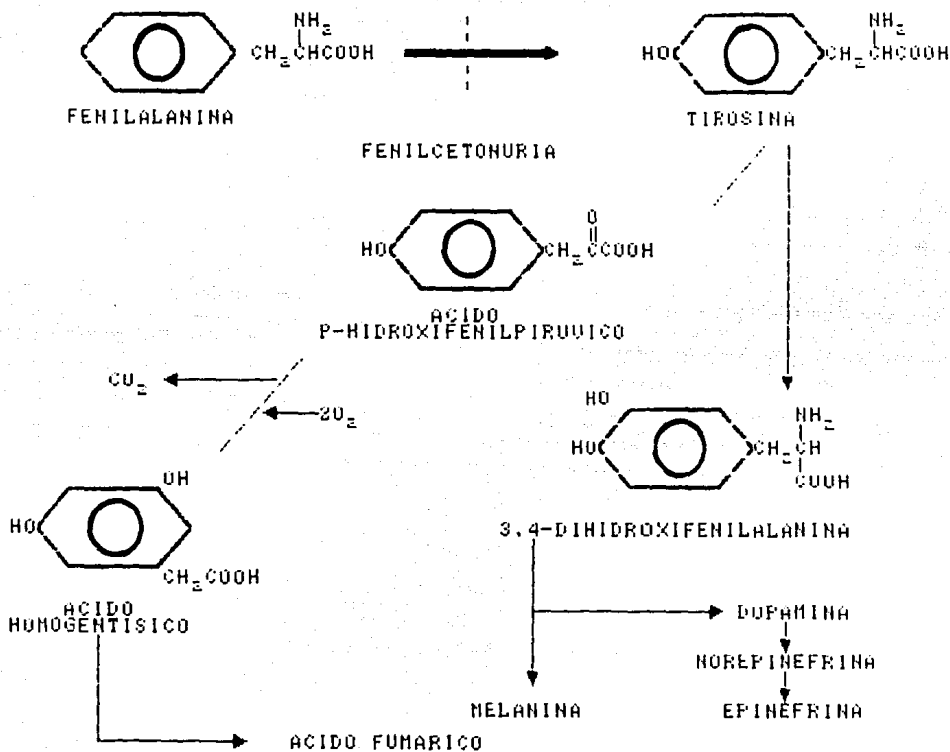


Fig 1. Metabolismo de la tirosina. La tirosina se oxida al acido homogentísico y finalmente a  $CO_2 + H_2O$  (no indicado). Tambien se metaboliza a dopamina, norepinefrina y epinefrina.

la sangre y en los tejidos. Las concentraciones anormales de este aminoácido y de sus metabolitos alteran directamente el desarrollo y el funcionamiento del cerebro. La excreción urinaria de ácido pirúvico es típica de este trastorno metabólico y se piensa que la formación y excreción de cetoácidos es una consecuencia directa de las altas concentraciones de fenilalanina en los tejidos (1).

El ácido fenilpirúvico, el ácido fenilacético y el ácido feniláctico, con sus derivados conjugados, fenilacetilglutamina. (Fig 2 ) son los principales productos metabólicos de la fenilalanina en la fenilcetonuria. Aunque cuantitativamente el metabolito más significativo es la fenilalanina, ya que alcanza concentraciones mayores a 20 mg / 100 ml de sangre, suero o plasma, en contraste al valor normal que se reporta entre 3 y 15 mg / 100 ml (1.2).

La etapa crítica del crecimiento y desarrollo del cerebro humano ocurre durante los primeros seis meses del periodo neonatal, ya que hay poca división celular después de los cinco meses de edad y solo ocurre crecimiento por incremento en el contenido de proteínas, DNA y lípidos de las células. Puesto que la mielinización no se completa sino hasta los cinco o seis años de edad. Concentraciones elevadas de fenilalanina o de sus metabolitos en los tejidos, pueden ser los mediadores de un

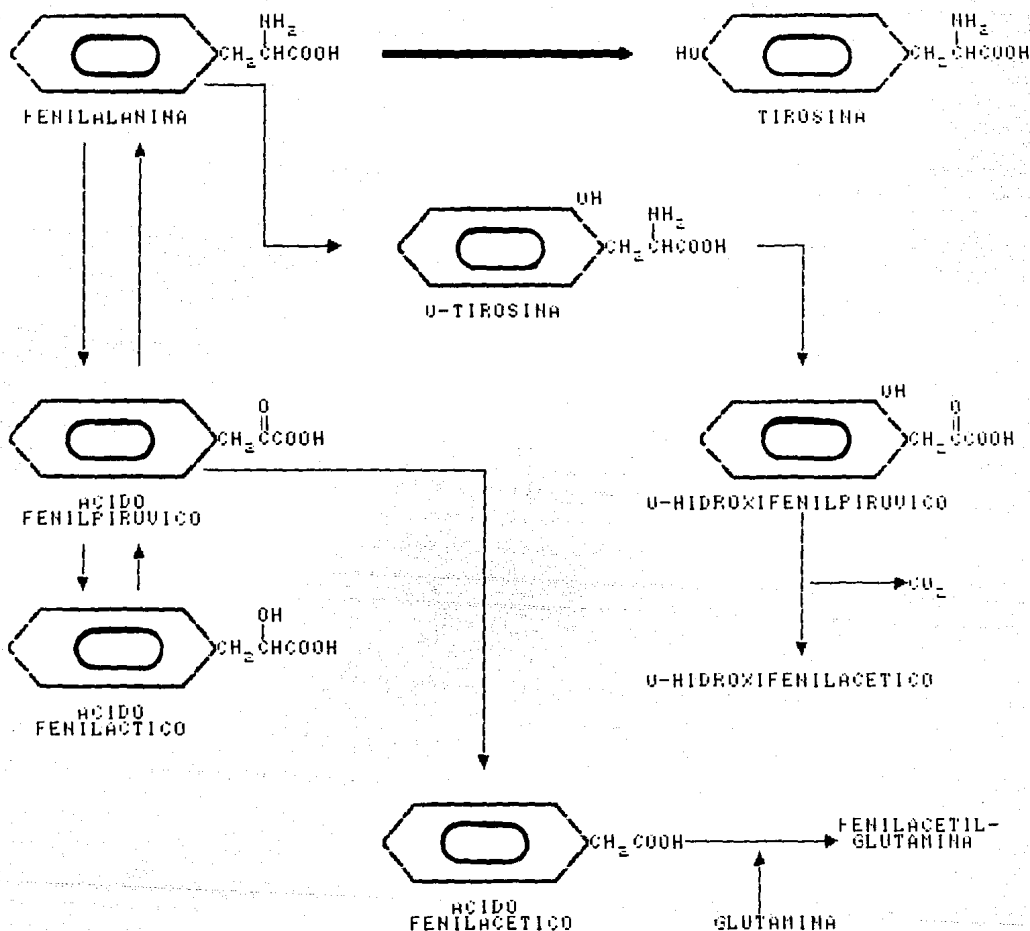


Fig 2. Metabolismo de la fenilalanina. El ácido fenilpirúvico, el ácido fenilactico y el ácido fenilacetico son los principales productos metabólicos de la fenilacetona.

ambiente bioquímico alterado, causando la falta de diferenciación del sistema nervioso central (S.N.C) del neonato y por tanto el retardo mental (3). El coeficiente intelectual que presentan los pacientes fenilcetonúricos es usualmente por debajo de 50 (1). Otros signos clínicos comunes son olor a ácido fenilacético, vómitos, irritabilidad, conducta hiperactiva, erupción cutánea, generalmente son de baja estatura. El 90 % de los pacientes tienen cabello, piel y ojos claros. Finalmente, un tercio de los pacientes presentan signos de parálisis cerebral (1) .

Hasta ahora, el único tratamiento efectivo para prevenir el retardo mental en pacientes con fenilcetonuria clásica es por medio de una dieta controlada, baja en fenilalanina, que debe iniciarse en las primeras semanas de vida, ya que el tratamiento después de los tres años de edad no tiene efecto alguno. Se ha calculado que cada 10 semanas de atraso en el tratamiento hay una pérdida de cinco unidades de coeficiente intelectual (1), por lo que es de suma importancia que se desarrollen programas de detección temprana para el descubrimiento de errores innatos del metabolismo y así poder evitar, a través del tratamiento oportuno, las consecuencias de este padecimiento.

El propósito del tratamiento es disminuir la concentración de fenilalanina circulante a concentraciones similares o un poco mayores que las que se encuentran en sujetos normales. Pacientes

con concentraciones por debajo de 10 mg de fenilalanina / 100 ml de sangre. suero o plasma generalmente no se tratan, pero si el nivel de fenilalanina persiste entre 15 - 20 mg / 100 ml. se les debe de reducir la concentración de fenilalanina en la dieta (2).

La cantidad de fenilalanina provista en la dieta debe de ser suficiente para satisfacer los demás requerimientos metabólicos. es decir, que el fenilcetonurico debe de disponer de la fenilalanina necesaria para el crecimiento. Dichos requerimientos pueden ser compensados por una dieta semisintética derivada ya sea de un hidrolizado enzimático o ácido de proteínas al que se le ha eliminado químicamente la fenilalanina, o bien de una mezcla de L-Aminoácidos sintéticos. Ambas dietas contienen respectivamente, una cantidad mínima o nada de fenilalanina o están completamente libres de este aminoácido (2,4). En la tabla 1 se comparan algunos sustitutos para proteínas obtenidos por hidrólisis enzimática o ácida o por mezcla de aminoácidos sintéticos.

La edad óptima a la cual puede terminarse la dieta baja en fenilalanina aún no se conoce. Algunos investigadores opinan que a los tres años es suficiente; para otros nunca es seguro y la mayoría la terminan a los diez años ya que a esta edad se llega al máximo desarrollo del cerebro (2). Otros autores toman como criterio la concentración de fenilalanina en el plasma, o sea que



mantienen la dieta siempre y cuando su concentración sea mayor a los 8 - 12 mg / dl (1.5).

La fenilcetonuria es un padecimiento que se encuentra distribuido por todo el mundo: ocurre en 1 cada 10.000 a 20.000 nacimientos vivos, variando la incidencia entre las poblaciones estudiadas.

La Unidad de Genética de la Nutrición del Instituto de Investigaciones Biomédicas en colaboración con el Sector Salud esta desarrollando un programa piloto para la detección temprana de la FCU además de otras alteraciones de tipo metabólico que forma parte del "Programa Nacional para la Prevención del Retardo Mental de Tipo Metabólico". Este programa tiene entre otras finalidades la de conocer la incidencia de fenilcetonuria en México y detectar tempranamente el padecimiento.

Actualmente la incidencia se estima en un caso cada 20.000 recién nacidos. Considerando que en México ocurren anualmente 2.500.000 nacimientos, 125 pueden ser fenilcetonúricos. Esta cifra es suficiente para justificar el desarrollo del producto necesario para llevar a cabo la dietoterapia de una manera rápida y sin interrupciones, ya que hasta ahora la disponibilidad de estos productos (LOFENALAC y MILUPA) se han visto limitada por dos razones:

Tabla 1. Composición (por 100 o de producto) de algunos sustitutos para proteínas.

COMPOSICION	PRODUCTO				
	MINAFEN	LOFENALAC	ALBUMAID XP	3229-A	PKU 1 MIX
Proteína (g) *	12.5	15	33.8	100	100
Fenilalanina (mo)	20	80	10	0	0
Energía (Kcal)	509	460	370	406	372
Hidratos de carbono (g)	47.9	57	50	66	80.9
Triglicéridos (g)	31	18	0	6.8	0
Vitaminas	algunas	mayoría	algunas	mayoría	algunas
Comentarios	hid. ac. de caseína	hid. enz. de caseína	hid. ac. de suero	mezcla de Aa sint	mezcla de Aa sint

\* Proteína : para productos basados en hidrolizados, este valor es el de proteína equivalente : hidrógeno total en 100g de producto x 6.25. Para productos basados en mezcla de aminoácidos sintéticos es el peso total de los aminoácidos.

hid. ac. = hidrólisis ácida.

Hid. enz. = hidrólisis enzimática.

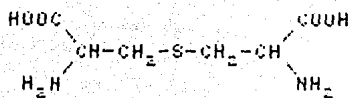
1. Los productos son de importación y de alto costo. A precios de 1986 una lata del producto comercial MILUFA de 500 g tenía un costo de entre US \$ 36.88 a 50.23 (más impuesto de importación). Si consideramos que un niño de 12 meses de edad consume 20 latas al año, el gasto total sería de US \$ 874.20 al año per cápita.

2 Los trámites burocráticos necesarios para la importación impiden muchas veces que este producto llegue a tiempo para poder asegurar una terapia continua.

El objetivo de este trabajo consiste en desarrollar un proceso para la elaboración de proteínas o productos libres de fenilalanina. Para su desarrollo se propone una hidrólisis enzimática y no una hidrólisis química, ni mezcla de aminoácidos debido a que :

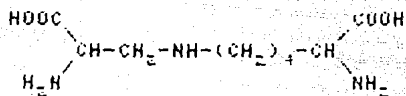
1. La hidrólisis alcalina provoca racemización, pérdida de cistina y lisina y formación de nuevos productos como lantionina, lisinoalanina y  $\beta$ -Aminoalanina (fig.3) que producen cambios en las propiedades físicas y químicas de las proteínas y por tanto en su valor nutritivo (6).

2. La hidrólisis ácida puede ocasionar el daño de algunos aminoácidos indispensables como el triptofano y en menor grado la



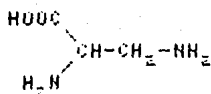
LANTIONINA

---



LISINOALANINA

---



B-AMINOALANINA

---

Fig 3. Estructura de la lisinoalanina, lantionina y B-aminoalanina. Estos productos se forman durante la hidrólisis alcalina de proteínas.

cistina, la treonina y la serina. También ocurre, dependiendo de las condiciones de hidrólisis, de 2 a 3 % de racemización en los aminoácidos.

Con ambos métodos las proteínas se fragmentan hasta aminoácidos libres, lo cual sería una desventaja pues pueden causar problemas de osmolaridad intestinal (7). Por otro lado, ambos tienen la ventaja de ser simples y económicos.

3. Las preparaciones basadas en mezclas de aminoácidos sintéticos resultan ser económicamente las más desfavorables, pues en México se producen únicamente lisina y metionina debiéndose importarse los 18 aminoácidos restantes; cabe señalar que próximamente se iniciará en México la producción de la fenilalanina para la síntesis de aspartamo.

Por otro lado, la mezcla de aminoácidos puede causar problemas de osmolaridad durante su absorción intestinal.

4. Los hidrolizados enzimáticos contienen péptidos. En comparación con la mezcla de aminoácidos sintéticos, se ha demostrado que la presencia de péptidos en el lumen intestinal incrementa la velocidad total de absorción de los aminoácidos (7). La ventaja principal de la hidrólisis enzimática es que los perfiles de aminoácidos permanecen iguales a los de la proteína original, sin ninguna destrucción de aminoácidos.

La hidrólisis enzimática ha recibido poca atención en comparación a los otros métodos, en cuanto al desarrollo de productos de dietas terapéuticas debido a su tendencia a producir péptidos amargos (7).

## II. OBJETIVOS

El objetivo global del proyecto consiste en obtener un producto bajo en fenilalanina, útil para la alimentación de pacientes con FCU. Para desarrollar este objetivo, el proyecto se divide en dos etapas:

A) En la primera etapa se llevará a cabo una hidrólisis enzimática sobre un sustrato proteínico, de buen valor nutricional (por su contenido en aminoácidos indispensables) con el fin de liberar al máximo la fenilalanina, de tal forma que su eliminación posterior sea más fácil.

B) La segunda etapa consiste en el desarrollo de alternativas de separación específica de la fenilalanina y la formulación del producto final.

Este trabajo se ubica principalmente dentro de la primera etapa.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseñar un sistema enzimático apropiado para obtener un producto que contenga el máximo de nitrógeno proteínico soluble, siendo la proporción de fenilalanina libre la variable a optimar

teniendo en cuenta los siguientes criterios:

1.1 Selección de la enzima en función de:

A) Su especificidad y eficiencia para la máxima liberación de fenilalanina

B) Su funcionamiento en las condiciones de pH de la proteína seleccionada.

C) Su costo y disponibilidad.

D) La posibilidad de emplear mezclas de enzimas, para que al combinar especificidades se aumente la liberación de la fenilalanina.

E) temperatura de reacción.

E.1 Estabilidad microbiológica.

E.2 Velocidad de reacción.

1.2 Relación tiempo-Reacción de enzima(s). La selección de uno de estos dos factores determina al otro. La mejor combinación resulta entonces de la optimación del costo considerando la relación :

costo de la enzima / costo del tiempo de proceso.



Dentro del tiempo de proceso, además del costo de producción, deben considerarse igualmente los riesgos de la proliferación microbiana

1.3 Selección de la base proteínica tomando en cuenta los siguientes criterios :

- A) Disponibilidad.
- B) Seguridad en el suministro.
- C) Costo.
- D) Características nutricias (composición de aminoácidos indispensables).

Tomando en cuenta los aspectos antes mencionados se pretende entonces diseñar las condiciones de proceso, para que mediante la acción de enzimas proteolíticas que actúan sobre una materia prima de adecuada calidad proteínica se obtenga un producto del cual sea factible la eliminación de la fenilalanina a través de procesos de adsorción o de destrucción específica.

### III. GENERALIDADES

#### 1. HIDROLISIS ENZIMATICA DE PROTEINAS

##### FACTORES QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCION Y EN LAS PROPIEDADES DE LOS HIDROLIZADOS.

Mientras que la especificidad de una enzima puede considerarse como el criterio básico para su selección, otros factores como la concentración de sustrato, [s] : el pH óptimo; la termoestabilidad; la presencia de activadores e inhibidores; el precio y la disponibilidad tienen también suma importancia para escoger a la proteasa apropiada.

##### 1) LA CONCENTRACION DE SUSTRATO.

La concentración de sustrato en el caso del proceso de hidrólisis de proteínas, se refiere generalmente al por ciento en peso de proteína en la mezcla de reacción, como en todo proceso de reacción químico o enzimático, mientras más alta sea la concentración de sustrato, más alta será la productividad, es decir producto obtenido por unidad de volumen y por unidad de tiempo. En el caso de las enzimas en general y las proteasas en particular, dos factores limitan la selección de la más alta concentración de sustrato: la solubilidad de la proteína, la disponibilidad de agua ( la reacción es de hidrólisis y por lo

tanto uno de los reactivos es agua ) y los eventuales problemas de inhibición por exceso de sustrato.

## ii) LA RELACION SUSTRATO-ENZIMA.

A diferencia de la mayor parte de las reacciones enzimáticas, donde se reporta la concentración de sustrato y de enzima por separado, en el caso de los procesos de hidrólisis de proteínas, la concentración de enzima no se refiere a la solución, sino a la cantidad de sustrato, proteína presente.

La relación sustrato-enzima e/s. se refiere a la relación del peso seco de la enzima añadida y el peso seco total del sustrato. Usualmente es mas característica de la velocidad de reacción que la concentración de enzima per se. El número de unidades de actividad por kg de sustrato es aún mas informativo.

Durante la hidrólisis de proteína de pescado se ha observado que un incremento en la concentración total de sólidos de pescado en el sistema resulta en una caída medible en la producción de péptidos solubles y en la velocidad inicial de hidrólisis. Este efecto puede estar relacionado al fenómeno de inhibición por producto que ocurre en el sistema, a diferencia de lo que sucede generalmente, ya que en ausencia de inhibición por sustrato la velocidad inicial es constante e igual a la máxima.

### iii) EL pH Y LA TEMPERATURA.

El pH y la temperatura se seleccionan normalmente según los óptimos de la proteasa usada, aunque en ocasiones es necesario seleccionar la proteasa en función del pH del alimento cual se hidroliza la proteína.

En ocasiones, el pH de la mezcla de reacción no se mantiene constante durante la hidrólisis, provocando que la velocidad de la reacción disminuya. Sin embargo, el pH se puede regular mediante la adición de ácido o base como se discutirá con más detalle en la sección 1.3.1.

En cuanto a la temperatura, es preferible trabajar con temperaturas mayores a 45 °C para evitar problemas de contaminación.

### iv) EL TIEMPO DE HIDROLISIS.

El tiempo de hidrólisis es otro factor importante, ya que hasta ciertos límites, la producción de péptidos solubles depende e incrementa con el tiempo de hidrólisis, disminuyendo al mismo tiempo la longitud promedio de las cadenas de los péptidos de la fracción soluble.

Conviene señalar que los productos de hidrólisis siguen siendo sustrato de la enzima y aparentemente no existe una relación entre velocidad y tamaño de la proteína, aunque si se ve afectada por las estructuras primaria, secundaria y terciaria de estas (8).

Como una regla general, el tiempo de hidrólisis necesario para alcanzar un valor pre-establecido del grado de hidrólisis (GH) es inversamente proporcional a la relación sustrato / enzima.

Adler-Nissen (9), encontró que a un valor dado de la relación sustrato-enzima, el tiempo de hidrólisis necesario para alcanzar un valor del grado de hidrólisis determinado es independiente de la concentración de sustrato dentro del rango de 6 - 12 % de proteína.

## 2. CLASIFICACION DE PROTEASAS

Las proteasas se clasifican según su fuente : animal, vegetal o microbiana : según su mecanismo de acción catalítica : endopeptidasas o exopeptidasas y según la naturaleza de su sitio catalítico : serina-proteasas; que tiene su máxima actividad a pH alcalino : proteasas cisteinicas, muy relacionadas con las serinas, pero tienen un grupo -SH en lugar de un -OH en el sitio

catalítico : metaloproteasas contienen usualmente Zn u otro metal y tiene su pH óptimo alrededor del valor neutro. Su estabilidad aumenta con el calcio y disminuye con agentes quelantes, como el edta; por último las proteasas ácidas que generalmente tienen un grupo carboxílico del ácido aspártico en el centro activo y su máxima actividad catalítica es a pH ácido.

En la industria de alimentos existen diversos procesos para la obtención de hidrolizados proteínicos. en general se usan endopeptidasas, aunque en ocasiones se combinan con exopeptidasas para lograr una mayor degradación.

En la tabla 2, se reportan algunos ejemplos de enzimas proteolíticas de aplicación en el sector alimentario (10).

### 3. CINETICA.

En esta sección se describen algunos elementos de cinética enzimática (11) que serán empleados en el desarrollo del proyecto.

La reacción más simple catalizada por enzimas involucra a un solo sustrato y lleva a un solo producto. La reacción de la secuencia es :

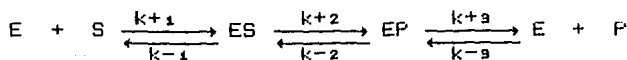


Tabla 2. Ejemplo de diversas enzimas proteolíticas empleadas en la industria de alimentos.

FUNTE	PROTEASA	NOMBRE COMUN	pH	ESPECIFICIDAD
<b>ANIMAL</b>				
res, cerdo	ácida	pepsina	1-4	aromático-COOH y NH <sub>2</sub> , leu-, asp- y glu-COOH
	serina	tripsina	7-9	lis-, arg-COOH
	serina	dimotripsina	8-9	fen-, tir-, tro-COOH
becerro	ácida	renina	3-6	fen-met
<b>VEGETAL</b>				
papaya	cisteínica	papaina	5-7	lis-, arg-, fen-X
latex hico	cisteínica	ficina	5-8	fen-, tir-COOH
<b>BACTERIAS</b>				
<i>B. amyloli quefaciens</i>	metaloproteasa	neutrasa	6-8	leu-, fen-NH <sub>2</sub>
<i>B. subtilis</i>	serina	subtilisina novo	6-10	hfb-COOH
<i>B. licheni formis</i>	serina	subtilisina carlsberg, alcalasa	6-10	hfb-COOH
<i>B. thermopro- teoliticus</i>	metaloproteasa	termolisina termososa	7-9	ile-, leu-, val- y fen-NH <sub>2</sub>
<b>HONGOS</b>				
<i>A. oryzae</i>	mezcla de áci- das, metalopro- teasas, seri- nas y carboxi- peptidasas.	panazina, pro- zima, biozima a y sanzima.	4-8	especificidad muy amplia
<i>A. niger</i>	ácida con carboxipep- tidasa	aspergilopep- tidasa A. proc- tasa y molsina	2.5-5	amplia especificidad

Continua Tabla 2.

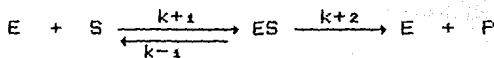
<u>S. griseus</u>	mezcla de alcalina, neu- tra, aminopep- tidasa y car- boxipeptidasa	pronasa	7-9	especificidad muy amplia
-------------------	---	---------	-----	-----------------------------

---

hfb = hidrofóbico



o si consideramos un solo complejo central y la irreversibilidad de la descomposición del mismo :



Si se asumen condiciones de equilibrio rápido, la enzima, el sustrato y el complejo enzima-sustrato se equilibran rápidamente en comparación a la velocidad con la que el complejo se rompe en enzima más producto.

La velocidad máxima que sería observada si toda la enzima se encontrara como complejo enzima-sustrato :

$$\frac{V_I}{V_{max}} = \frac{\frac{[S]}{K_s}}{1 + \frac{[S]}{K_s}}$$

La ecuación de velocidad para un sistema simple de un reactante se puede re-arreglar para dar la ecuación de Henri-Michaelis-Menten :

$$\frac{V_I}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

esta ecuación nos da la velocidad relativa a la  $V_{max}$  a una concentración de sustrato dada. La ecuación es válida únicamente si la velocidad inicial se mide en un tiempo suficientemente corto, entre otras razones, para que la concentración del sustrato permanezca esencialmente constante.

Si la velocidad a la cual el complejo enzima-sustrato forma enzima más producto es más rápida que la velocidad a la cual se disocia a enzima más sustrato ; entonces la enzima, el sustrato y el complejo enzima-sustrato no están en equilibrio. Si la enzima se encuentra en cantidades catalíticas, esto es que  $[s] \gg [e]$ , se alcanza rápidamente un estado estacionario, donde el complejo enzima-sustrato permanece casi constante con el tiempo y por lo tanto es igual a la velocidad a la que se descompone.

La  $K_m$ , constante de Michaelis, relaciona la velocidad de una reacción catalizada por una enzima a una concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial corresponde a la mitad de la velocidad máxima :

$$V_i = \frac{[s]}{K_m + [s]} V_{max}$$

cuando la concentración de sustrato equivale al valor de la  $K_m$  :

$$V_i = \frac{K_m}{K_m + K_m} V_{max}$$

$$V_i = 1 / 2 V_{max}$$

El valor de  $K_m$  ofrece una manera de comparar enzimas de diferentes organismos o de diferentes tejidos del mismo organismo o del mismo tejido en distintos estados de desarrollo. Si medimos el efecto de diversos compuestos sobre el valor de  $K_m$ , se pueden identificar inhibidores importantes. Conociendo el valor de  $K_m$  se

pueden ajustar las condiciones del ensayo a que la concentración del sustrato sea mucho mayor que el valor de  $K_m$  para determinar la velocidad máxima y por lo tanto la concentración total de enzima. Mientras más pequeño sea el valor de  $K_m$ , existirá una mayor afinidad aparente de la enzima por el sustrato.

En la mayoría de las curvas de hidrólisis de velocidad inicial contra concentración de sustrato, se pueden distinguir dos regiones importantes en donde la velocidad responde de una manera característica a incrementos en la concentración de sustrato. A concentraciones muy bajas,  $[s] \lll K_m$ , la curva de velocidad inicial contra concentración de sustrato es esencialmente lineal, por lo que la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Esta región tiene una cinética de primer orden y la ecuación que la describe es :

$$V_i = \frac{V_{max}}{K_m} [s] \quad \text{o} \quad V_i = K [s]$$

$k$  es la constante de velocidad de primer orden, cuyas unidades son en tiempo<sup>-1</sup>. Esta constante aproxima la fracción de sustrato presente que se convierte a producto en un intervalo de tiempo pequeño.

A concentraciones de sustratos muy altas,  $[s] \ggg K_m$ , la velocidad es constante y esencialmente independiente de la concentración de sustrato. Esta región presenta una cinética de

orden cero, cuya ecuación de velocidad es :

$$V_I = \frac{V_{\max}}{[S]} [S] \quad \text{o} \quad V_I = V_{\max}$$

Los valores de  $V_{\max}$  y de  $K_m$  se pueden obtener a partir de la gráfica hiperbólica de velocidad en función de la concentración de sustrato. No obstante, en la práctica se emplean algunas de las modificaciones algebraicas de la ecuación de Michaelis. El más común es el método de Lineweaver y Burk, en el que el recíproco de la ecuación de una hipérbola rectangular es la ecuación de una línea recta. De la ecuación de Michaelis :

$$V_I = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

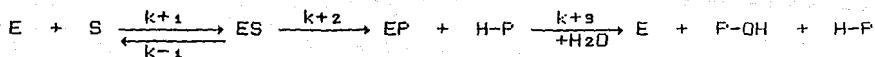
obtenemos :

$$\frac{1}{V_I} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{S}$$

### 3.1 CINÉTICA DE PROTEASAS.

En suspensiones y soluciones acuosas de proteínas, la catálisis por proteasas lleva el equilibrio hacia la degradación y no hacia la síntesis de moléculas mayores, ya que es favorecido termodinámicamente por la contribución de la energía libre de la ionización de los grupos amino y carboxilo.

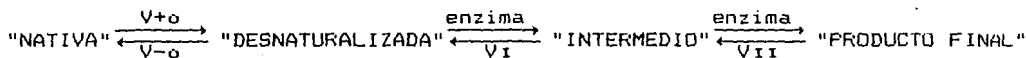
La catálisis para las serina-proteasas, la principal clase de proteasas, obedece la cinética clásica de Michaelis-Menten :



el paso de acilación, o sea el segundo paso de la reacción, es el paso determinante de la velocidad. Esto significa que la velocidad total de reacción esta determinada por  $k_{+2}$  y que la  $K_m$  es aproximadamente igual a la constante de disociación verdadera  $k_{-1} / k_{+1}$ .

### 3.1.1 HIDROLISIS INICIAL (Linderstrom-Lano).

En el siguiente esquema (12) se simplifica la discusión sobre proteólisis inicial de Linderstrom-Lang que puede explicar algunas de las observaciones hechas en hidrólisis de proteínas globulares :



Durante la hidrólisis de proteínas globulares, la proteína nativa se desnatura mediante un proceso reversible regulado por la velocidad de desnaturalización :

$$V_0 = V_{+0} - V_{-0}$$

y por la constante de equilibrio de la desnaturalización reversible :

$$K_0 = K_{-0} / K_{+0}$$

La proteína desnaturalizada forma, en presencia de la enzima, un compuesto intermedio durante una reacción no reversible con velocidad  $V_i$ . Este compuesto intermedio, también en presencia de la enzima, se transforma en producto final mediante una reacción no reversible con velocidad  $V_{ii}$ .

La hidrólisis inicial puede ocurrir ya sea por una reacción "uno a uno" o por una reacción de "Zipper".

i) REACCIÓN UNO A UNO.

Cuando  $V_0$  es mucho menor que  $V_i$ , la reacción reversible será la que define la velocidad determinante y la hidrólisis procederá con una cinética controlada por  $V_0$ . No habrá cantidades apreciables del producto intermedio, es decir de proteína desnaturalizada. La mezcla de reacción consistirá únicamente de proteína nativa y de producto final. Esto indica que en un tiempo dado una molécula de proteasa degradará a una molécula de sustrato (10).

ii) REACCIÓN DE "ZIPPER".

Cuando  $V_i$  es mucho menor que  $V_0$ , las proteínas nativas se convierten rápidamente a la forma desnaturalizada, que se degradará más lentamente al producto final.

Las reacciones proteolíticas son casos intermedios entre estos dos tipos. En muchas reacciones de hidrólisis,  $V_i$  y  $V_{ii}$  son de la misma magnitud y se observará una reacción gradual de péptidos pequeños y de producto final. Si  $V_{ii}$  es mucho menor que  $V_i$  se forma una cantidad apreciable del intermediario estable como es el caso de la formación de enzimas proteolíticas a partir de sus precursores (10).

### 3.1.2 LA CURVA DE HIDROLISIS.

En experimentos de hidrólisis realizados de proteína de soya y en caseína con alcalasa bajo las siguientes condiciones :

$$[s] = 12 \%$$

$$e/s = 12 \text{ AU / kg}$$

$$\text{pH} = 8$$

$$T = 50^\circ \text{ C}$$

Adler-Nissen (12) llegó a la conclusión de que en este sistema la  $K_m$  es independiente del grado de hidrólisis ( $G_H$ ) y que es tan pequeña, que la saturación de sustrato prevalece en todos los valores del grado de hidrólisis. Este comportamiento parece ser muy típico en las reacciones de hidrólisis de proteínas de alimentos a pH neutro y alcalino, ya que para otros cuatro sustratos y enzimas y bajo condiciones comparables, la  $K_m$  es de la misma magnitud y por debajo del 1%. La  $K_m$  puede cambiar con el

pH y con la temperatura, sin llegar a ser un cambio considerable.

De lo anterior se postula que a concentraciones de sustrato elevadas para procesos de hidrólisis de proteínas, la saturación por sustrato prevalece prácticamente a lo largo de toda la reacción. Sin embargo, la curvatura descendente de las curvas de hidrólisis no siempre pueden explicarse por un simple agotamiento de sustrato según la ecuación integrada de Michaelis-Menten :

$$V_t = -ds/dt = V_{max} s / (K_m + [s])$$

$$t = \frac{S_0 X - K_m \ln (1 - X)}{V_{max}}$$

donde

t = tiempo de reacción

S<sub>0</sub> = Concentración inicial

X = Conversión S<sub>0</sub> - S/S<sub>0</sub>

V<sub>max</sub> = actividad enzimática de la reacción

ni por una inactivación de la enzima.

Una explicación puede ser la presencia de productos de inhibición formados durante la hidrólisis a valores de pH altos. La forma de la curva también puede explicarse como un resultado de la competencia de sustrato entre el sustrato original y los péptidos que son formados continuamente durante la hidrólisis (10). Finalmente la especificidad hacia enlaces peptídicos y el mecanismo endo de las proteasas pueden igualmente ser argumento para la explicación de este fenómeno.

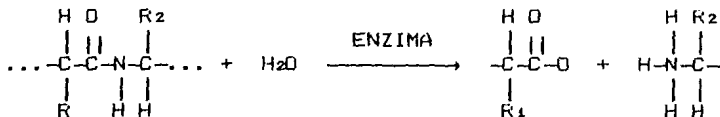


### 3.1.3 CONTROL DE pH.

El uso de la técnica del pH-stat automático para seguir una reacción proteolítica se inició en los Laboratorios Carlsberg quienes en su trabajo sobre la conversión de ovoalbumina en plakalbumina demostraron que el método es preciso para seguir la ruptura de una unión peptídica simple en la molécula de ovoalbumina (14).

En cuanto a las proteínas en alimentos, se han realizado gran cantidad de estudios cinéticos utilizando la técnica de pH-stat, principalmente para estimar el valor numérico de parámetros clave como la  $K_m$  (13,15).

El pH-stat es un método conveniente para determinar el grado de hidrólisis en una reacción proteolítica, siempre y cuando sea llevada bajo condiciones neutras o alcalinas. Las proteinasas ( endopeptidasas ) atacan las uniones peptídicas en las proteínas según el siguiente esquema :



Después de la hidrólisis, los grupos carboxilo y amino estarán más o menos ionizados, según el pH de la reacción de hidrólisis.

A 25 °C. el pK de los grupos carboxilo es de 3.1 a 3.6 y el de los grupos alfa-amino es de 7.5 a 7.8 .

Por lo tanto el grupo carboxilo estará :

- Sin disociarse debajo de pH 2
- Parcialmente disociado a pH de 2 a 5
- Fuertemente disociado arriba de pH 5.

El grupo amino estará :

- Fuertemente protonado debajo de pH 6
- Parcialmente protonado a pH de 6 a 9.5
- No protonado arriba de pH 9.5 .

De aquí se puede observar que la hidrólisis de proteínas es acompañada por la liberación o el consumo de H<sup>+</sup> . Esto significa que el pH cambia durante la reacción de hidrólisis, excepto en la región de pH de 5 a 6, donde el consumo y la liberación de protones se cancela entre sí. Debajo del pH de 3.1 a 3.6 . El grupo carboxilo estará poco disociado y el grupo amino estará fuertemente protonado y si el pH no se controla se observa un fuerte incremento en el pH. Del mismo modo, a valores de pH por arriba de 7.5 a 7.8 ( 25 °C ) menos de la mitad de los grupos amino estarán protonados pero los grupos carboxilo estarán fuertemente disociados y como una consecuencia el pH disminuirá si no es controlado.

A valores de pH fuera del intervalo dado para los valores de pK de los grupos amino y carboxilo, la reacción de hidrólisis a un pH constante procederá bajo el consumo de cantidades considerables de ácido o base con el fin de titular los grupos carboxilo y amino liberados. De aquí que si el pH se mantiene constante, ejem. pH 8, la relación entre las uniones peptídicas equivalentes rotas y el consumo de base equivalente es proporcional. La constante de proporcionalidad es simplemente el grado de disociación de  $+H_3N^-$ , el cual es 0.666 (suponiendo  $pK = 7.7$ ). Mediante este principio, con la técnica del pH-stat se puede vigilar continuamente el grado de hidrólisis durante la reacción.

Debe mencionarse que los valores de pK cambian con la temperatura y con la longitud de las cadenas peptídicas (16) además, la ionización de las cadenas laterales y el incremento de la capacidad de amortiguador juegan un papel importante para el funcionamiento del pH-stat (17) a valores de pH adentro del rango de los valores de pK la técnica de pH-stat es en principio aplicable, excepto para el intervalo de pH de 5 a 6.

#### 4. PROBLEMAS DE SABOR.

Una característica mencionada frecuentemente sobre los hidrolizados protéicos es su sabor amargo particular.

De las primeras observaciones hechas por Murrav y Baker (18) y por Matoba et al (19) sobre hidrolizados enzimáticos de caseína y el desarrollo de sabor amargo se demostró que este es debido a aminoácidos hidrofóbicos presentes en péptidos más que a aminoácidos libres y que estos péptidos pueden ser adsorbidos por adsorbentes hidrofóbicos. En otras investigaciones hechas en hidrolizados de caseína por Gordon y Soeck (20) se observó que el sabor amargo se debía a un péptido rico en prolina. En estudios con péptidos sintéticos, Kirimura et al (21) investigaron que los péptidos amargos contenían aminoácidos neutros con grandes cadenas laterales de alquilos o aromáticos.

La caseína, que es una de las proteínas más hidrofóbicas entre las proteínas más comunes en alimentos, tiende a formar un amargor pronunciado aún en hidrólisis muy limitadas.

Matoba y Hata (22) explican el desarrollo del amargor por hidrólisis de moléculas proteínicas globulares. En estas, la mayoría de las cadenas laterales hidrofóbicas están escondidas en el interior y no pueden interactuar con los receptores del sabor. Cuando la proteína es degradada por hidrólisis, el péptido que contiene muchos aminoácidos hidrofóbicos se expondrá al solvente y así puede interactuar con los receptores del sabor.

Según Adler-Nissen (13) debe existir una relación entre el GH y el amargor. A valores bajos de GH, el poco amargor se debe

tanto a la baja concentración de péptidos como a que los primeros péptidos formados son aún muy grandes. Los péptidos grandes son capaces de cubrir de algún modo sus cadenas laterales hidrofóbicas por interacciones hidrofóbicas formando péptidos con forma de "U" o de racimos. Estos pueden ser degradados a péptidos más pequeños aumentando así el amargor. Sin embargo, a valores de GH muy altos, la degradación de péptidos amargos pequeños a péptidos con aminoácidos hidrofóbicos terminales o aun a aminoácidos libres resultará en una disminución del amargor.

#### 4.1 METODOS PARA REDUCIR EL SABOR AMARGO DE LOS HIDROLIZADOS DE PROTEINAS

Debido a que la presencia o ausencia del amargor es a menudo el criterio original para rechazar o aceptar un hidrolizado de proteínas para uso industrial, el desamargamiento de hidrolizados de proteínas ha estado sujeto a muchos estudios. Los métodos pueden ser clasificados en cuatro grupo :

- 1) Separación selectiva
- 2) Reacción de plasteina
- 3) Enmascaramiento
- 4) Aplicación de exopeptidasas

## 1) Separación selectiva

Varios investigadores han reportado el uso de adsorbentes hidrofóbicos para la remoción selectiva de péptidos amargos. El método más viejo y el más usado parece ser el tratamiento con altas dosis de carbón activado (18,23 Y 24). Otros adsorbentes eficientes son las resinas fenólicas de formaldehído (25). Las de fibra de vidrio (23) y las hexil sefarosas (26).

## 2) Reacción de plasteína

El efecto de desamargamiento debido a esta reacción fue descubierto y estudiado por Fujimaki, Yamashita y colaboradores (27).

La plasteína es una sustancia proteinacea parecida a un gel que puede obtenerse al incubar un concentrado de hidrolizado proteinico con una proteasa bajo condiciones apropiadas. La producción de plasteína depende del tipo de sustrato y enzima, de la concentración de sustrato y del pH.

Originalmente se creyó que la reacción de plasteína era una resíntesis de la proteína, sin embarco. Horowitz y Haurowitz (28) demostraron que el contenido de grupos alfa-amino no cambia durante la reacción de plasteína; además, la resíntesis de

proteínas es termodinámicamente muy desfavorable (29), por lo que se ha abandonado esta hipótesis y en su lugar se ha establecido que la plasteína se forma como resultado de una transpeptidación (30).

A través de la transpeptidación, algunos de los péptidos estarán enriquecidos con aminoácidos hidrofóbicos que son poco solubles y que condensan en pequeñas partículas para formar las plasteínas insolubles (31). Por tanto la formación del gel es inducida por interacciones hidrofóbicas. Esto explica el efecto desamarante de la reacción de plasteína ya que las cadenas laterales hidrofóbicas se esconden y son incapaces de interactuar con los receptores del sabor (22).

La reacción de plasteína también demostró ser eficiente en la incorporación de ésteres de aminoácidos de la cadena peptídica a través de la transpeptidación. Esa propiedad se ha utilizado para introducir aminoácidos indispensables dentro de una cadena peptídica siempre y cuando se obtengan productos proteicos con una composición equilibrada de aminoácidos (32,33).

### 3) Enmascaramiento.

Sustituye a la reacción de plasteína si se desea obtener un hidrolizado soluble de proteínas. Se han aprobado varios

componentes para enmascarar el sabor amargo de los hidrolizados proteicos :

- Dipéptidos de ácido glutámico (34)
- Adición de glicina libre (35)
- Polifosfatos
- Hidrocoloides como la goma guar, la pectina y la maltodextrina
- Gelatina.

#### 4) Aplicación de exopeptidasas.

El uso de aminopeptidasas y de carboxipeptidasas en los hidrolizados de proteína resulta de las siguientes observaciones:

Los aminoácidos libres son mucho menos amargos que los péptidos correspondientes.

El amargor es mayor cuando los aminoácidos hidrofóbicos no son terminales.

La única desventaja del uso de exopeptidasas es que alcanzan valores muy altos del grado de hidrólisis; por lo que el hidrolizado consiste principalmente de aminoácidos libres y de péptidos pequeños, lo que dá como resultado una osmolaridad muy alta del producto final.



## 5. PROCESOS PROPUESTOS PARA LA ELABORACION DE ALIMENTOS BAJOS EN FENILALANINA (ABFA).

Los procesos propuestos para la elaboración de ABFA utilizan los métodos ya mencionados para desamargar hidrolizados de proteínas, siendo el más común el de separación selectiva. Uri Coqan y colaboradores (36) parten de una solución de caseína al 6.25 % y la hidrolizan con papaína por 18 Horas, seguida de pepsina por otras 22 horas o con Rhozyme-62 por 4 horas. Después de centrifugar el hidrolizado y separar el sobrenadante. lo mezclan con una cierta cantidad de carbón activado y dejan que la suspensión se agite por 60 minutos a 25 °C. Posteriormente filtran y analizan la composición de aminoácidos, reportando una disminución significativa en todos los aminoácidos aromáticos : el triptofano se reduce en un 63.1 %, la fenilalanina en un 36.1 % y la tirosina en un 24.4 %.

Otros investigadores parten de leche en polvo descremada como sustrato y la hidrolizan con alcalasa (24). Helbig y colaboradores (23) utilizan caseinato de sodio como sustrato y la hidrolizan con pronasa o ficina y prueban carbón activado y fibra de vidrio como material adsorbente.

S. Arai y colaboradores (37) parten de un concentrado de proteína de suero lacteo (CPS) al 1 % y lo hidrolizan con pronasa por 5 horas o con mezclas de  $\alpha$ -quimotripsina (2 Hrs) con pronasa

(5 Hrs); papaina (2 Hrs) con pronasa (5 Hrs) o de pepsina (2 Hrs) con pronasa (5 Hrs). Es con la mezcla de pepsina-pronasa con la que se obtiene un mayor rendimiento. Al final de la hidrólisis ajustan el pH a 4.5 y la fracción soluble que se obtiene con esta precipitación la aplican a una columna cromatográfica de sephadex G-15 y se recupera la fracción que consiste de péptidos bajos en fenilalanina (0.4 %), y que carece de aminoácidos libres.

Yamashita y Colaboradores (38) usan como sustrato proteína de pescado o proteína de soya y lo hidrolizan con pepsina y pronasa. El hidrolizado se centrifuga y el sobrenadante se separa en una columna de sephadex G-15 para eliminar a los aminoácidos libres. La mezcla de péptidos restantes se incuba con papaina junto con ésteres de tirosina y triptofano para que se efectúe la síntesis de plasteína. Posteriormente la plasteína se purifica obteniéndose un producto de sabor ligero, rico en tirosina y con un bajo contenido de fenilalanina. Sin embargo este proceso resulta tecnológicamente muy complicado.

## 6. DISPONIBILIDAD DE ENZIMAS PROTEOLITICAS.

Las proteasas disponibles en el mercado nacional con potencial de ser usadas en el desarrollo de un proceso para la elaboración de alimentos bajos en fenilalanina son HT-proteolytic

200 , papaina, proteasa Amano-2A v proteasa N. De ellas solo HT-protelytic 200 se produce en el país y las restantes son de importación. Sus características más importantes estan señaladas en la tabla 3. Todas son de grado alimentario, factor fundamental que hace posible su aplicación en alimentos.

Tabla 3. Proteasas disponibles de uso potencial en la elaboración de alimentos bajos en fenilalanina.

	HT-PROT	PAPAINA	AMANO-2A	PROTEASA N	FRONASA
ORIGEN	<u>bacillus subtilis</u>	latex de papaya	<u>aspergillus oryzae</u>	<u>bacillus subtilis</u>	<u>streptomycetes griseus</u>
pH optimo	7.2	5.5	7.0	7.0	6.5-8.0
t °C optima	55	65	50	55	40
actividad reportada	200 NU/g	*	40 NU.g	2600 NU/g	4 V/g
empresa	ENMEX	ENMEX	AMANO	AMANO	SIGMA
costo USD /kg	10	40	100	250	20.800
USD/NU	$5 \times 10^{-5}$	—	$20.5 \times 10^{-4}$	$90.6 \times 10^{-6}$	—

\* Las unidades de papaina varían según la aplicación que se le dé a la enzima.

## 7. ALTERNATIVAS DE MATERIA PRIMA.

Las materias primas que podrían ser empleadas como posibles sustratos para la obtención de productos bajos en fenilalanina se seleccionaron con base en su disponibilidad, costo, seguridad en el suministro y por su valor nutritivo. Entre estas tenemos a las proteínas de la leche, ya sea como leche en polvo descremada o como caseína; proteínas de pescado; proteínas de la soya y gelatina.

### PROTEINAS DE LA LECHE.

Las proteínas de la leche son de las mejor caracterizadas de todas las proteínas en alimentos. Tanto las proteínas de la leche como los hidrolizados han tenido una gran tradición en alimentos para dietas especiales.

La LPD, aunque sea un producto de importación (Francia, Canada y Nueva Zelandia) se cuenta con seguridad en el suministro a través de LICONSA. Desde el punto de vista de nutrición infantil, es una buena alternativa. Su costo es de 2 US \$/kg y con base en su contenido de proteína es de 5.7 US \$/kg.

El caseinato de sodio es otra opción excelente, ya que contiene un 88.5 % de proteína y por la ausencia de lactosa se

pueden disminuir ciertos problemas de contaminación durante el proceso y de intolerancia por algunos pacientes. Desafortunadamente tiene un costo aproximado de 7.0 US \$/kg de proteína. Entre otros proveedores, se puede obtener de Complementos Alimenticios S.A .

#### PROTEINAS DE PESCADO.

El interés en la hidrólisis de proteínas de pescado se originó en los años 60 y ha venido incrementandose desde entonces. Su principal uso ha sido como alimento para animales o para usos no dietéticos, en producción de peptonas para medios de fermentación (39). En Francia, se ha producido comercialmente un hidrolizado de proteína de pescado (HPP) como sustituto de leche para becerros. Se ha excluido de los alimentos para consumo humano aparentemente por problemas de amargor y por su sabor a pescado (40), aunque se han desarrollado algunos procesos de hidrólisis de proteínas de pescado dirigidos hacia la elaboración de productos alimenticios, como ha sido el someter a la proteína de pescado a una hidrólisis limitada con bromelina, lo cual evita la formación de amargor. Por su composición de aminoácidos, el problema del amargor debe ser igual o ligeramente menos severo que el de un hidrolizado de proteína de soya.

Los HPP importados de Francia pueden ser un sustrato

alternativo si se superan los problemas de sabor a pescado y el amargor. Este producto cuenta con una calidad insuperable si se compara con los derivados de proteína de pescado nacionales. Su costo es de 1.55 US \$/kg de producto o de 1.88 US \$/kg de proteína.

#### GELATINA.

Los hidrolizados de gelatina no desarrollan sabor amargo y si se combinan con hidrolizados de caseína, es posible obtener una mezcla con un perfil de aminoácidos adecuada y que sea organolepticamente aceptable. Además, la gelatina tiene un costo aproximado de 3.0 US \$/kg de producto.

#### PROTEINAS DE SOYA.

En el campo de hidrólisis de proteínas en alimentos, ha dominado el uso de proteínas de soya como sustrato debido al interés en sus propiedades funcionales. Las proteínas de soya se aplican ampliamente en alimentos por sus propiedades espumantes, humectantes, emulsificantes, gelantes, etc. .

El uso de proteínas de soya aumentó cuando la proteína de soya se introdujo como extensor de carnes. Los hidrolizados de proteínas de soya también se pueden utilizar con este fin.

Actualmente, los hidrolizados de proteína de soya han ganado importancia en la fortificación nutricional de alimentos, se utilizan en alimentos de pH bajo, como los refrescos, en los que los hidrolizados de proteína de soya permanecen solubles, sin causar turbidez ni sabor amargo (13,42).

En la tabla 4 se presenta la evolución de los precios de diversas proteínas usadas en la industria.

Tabla 4. Evolucion de los precios de diversos productos proteínicos empleados en la industria ( en miles de pesos por kilogramo de proteína.

PRODUCTO	% proteína	03/87	06/87	09/87	12/87	08/87
caseinato de sodio	88	5.9	7.86	9.83	12.87	15.0
leche decremada	34	4.86	6.47	8.09	10.15	14.34
suero lacteo en polvo	12.5	4.44	6.19	7.74	13.20	16.80
c. p. p. (1)	73.0	1.38	1.96	2.19	3.39	3.52
c.s.p.o. (2)	84	1.76	2.60	2.76	4.29	4.44
harina de soya	46	2.58	2.46	3.20	4.85	6.25

(1) concentrado de proteína de pescado

(2) concentrado soluble de proteína de pescado

En la tabla 5 se presenta la composición de aminoácidos de las proteínas propuestas para el proceso.

Tabla 5. Composición de aminoácidos de las materias primas propuestas para el proceso (g/100g) (41).

MATERIA PRIMA

COMPOSICION		CASEINA	LPD	HPP	HARINA SOYA	GELATINA
ácidos	asp	7.13	7.67	n.d.	12.30	6.60
	glu	22.04	20.50	n.d.	19.70	11.40
hidrofóbicos	val	6.74	6.36	4.40	4.96	2.63
	leu	9.51	9.72	6.50	7.98	3.36
	ile	5.41	5.18	3.90	5.08	1.70
	fen	5.24	4.75	3.70	5.04	2.33
	tir	5.82	4.88	2.80	3.61	0.23
	trp	1.61	1.39	0.90	1.25	0.00
azufrados	pro	11.58	11.54	n.d.	5.32	16.50
	met	2.79	2.50	3.00	1.21	0.82
	cis	0.36	0.92	n.d.	1.22	0.00
básicos	lis	8.12	7.11	7.40	6.18	4.70
	arg	3.75	3.34	6.80	7.18	8.90
	his	2.92	2.81	1.70	2.45	0.76
neutros	gli	1.97	1.95	n.d.	4.24	27.60
	ala	3.07	3.36	n.d.	4.39	11.30
	ser	6.03	5.60	n.d.	5.09	4.15
	tre	4.66	4.13	4.20	4.01	2.27

n.d = no determinado



#### IV. MATERIALES Y METODOS.

##### 1. SUSTRATO Y ENZIMAS.

Los sustratos evaluados para efectuar la hidrólisis fueron :

- a) Leche en polvo descremada (LPD)
- b) Caseína
- c) Gelatina
- d) Proteína de pescado

Las enzimas proteolíticas que se emplearon son :

- a) HT-proteolytic 200 (ENMEX S.A)
- b) Papaína (ENMEX S.A)
- c) Proteasa "AMANO" 2A (ENZIMAS y PRODUCTOS QUIMICOS)
- d) Proteasa N (ENZIMAS Y PRODUCTOS QUIMICOS)
- e) Pronasa (SIGMA)

##### 2. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA.

En la sección de resultados se mencionan los criterios de selección de la LPD como materia prima.

La LPD se sometió a análisis de nitrógeno proteínico, lípidos, cenizas, humedad y lactosa utilizando los métodos de la AOAC (43).

### 3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

#### 3.1 PREPARACION DEL SUSTRATO.

La LPD se reconstituyó en agua destilada a 50 °C para obtener la concentración de proteína deseada para cada hidrólisis. La suspensión final quedo con un pH =  $6.2 \pm 0.3$  . La concentración de sustrato esta reportada en gramos de proteína total por litro de mezcla de reacción.

#### 3.2 PREPARACION DE LAS ENZIMAS PROTEOLITICAS.

Las diferentes proteasas se disolvieron en agua o en solución amortiguadora de citratos, pH = 6.0 .La concentración de la enzima está reportada en gramos de enzima por 100 gramos de sustrato o bien en gramos de enzima por litro. Ambas se refieren a la concentración de enzima en la mezcla de reacción final.

Las proteasas usadas en los experimentos de hidrólisis se caracterizaron en término de su actividad enzimática cuantificada por el método de Anson (44) modificado :

La leche al 5 % de proteína (50 g/l) fué digerida por cada proteasa a dos concentraciones diferentes (HT, papaina y Amano-2A al 1.0 y 0.5 % e/s, proteasa N al 0.25 y 0.125 % e/s) a un pH de  $6.2 \pm 0.3$  y a 50 °C por 15 minutos. Se tomaron alícuotas cada 5

minutos. Utilizando ATCA al 5 % se detuvo la digestión y precipitó la proteína no digerida. Después de filtrar la muestra precipitada en papel filtro #42 quedan en el sobrenadante péptidos con un tamaño promedio de 330 - 380 daltones (45).

Un cierto volumen del filtrado (2.5 ml) se alcalinizó con hidróxido de sodio 0.5 N (5.0 ml) y se le añadió el reactivo de fenol, folin-Ciocalteu (1.5 ml) en una relación 1:3 con agua. el cual da un color azul proporcional a la concentración de tirosina y triptofano, que se lee a 750 nm contra una curva patrón de concentración de tirosina.

En nuestros experimentos, una unidad equivale a la cantidad de proteasa que libera un micromol de tirosina por minuto bajo las condiciones del análisis (definición internacional).

#### 4. DIGESTION ENZIMATICA DE LA LECHE.

Los diferentes procesos de hidrólisis se efectuaron en reacciones por lotes, ya que en comparación con los procesos continuos, es más fácil controlar el pH, la temperatura y las condiciones de higiene, además la cinética se puede investigar fácilmente.

El pH utilizado con todas las proteasas fué el propio de la

leche,  $6.2 \pm 0.3$  . La temperatura se mantuvo a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (excepto con la pronasa), ya que es la más adecuada en procesos enzimáticos cuando existen riesgos de contaminación, además de que es la temperatura óptima de las proteasas usadas.

La reacción de hidrólisis se detuvo por inactivación rápida de la(s) enzima(s), ya fuera por adición de ATCA o por calor como fué el caso de la hidrólisis con Amano-2A seguida de la digestión con pronasa.

#### 5. HIDROLISIS ACIDA.

Las muestras de interés se hidrolizaron con ácido clorhídrico 6 N desgasificado, a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, para poder efectuar el análisis de contenido total de aminoácidos (42).

#### 6. SEGUIMIENTO DEL PROCESO HIDROLITICO.

Durante la hidrólisis péptica se tomaron alícuotas a intervalos de tiempo apropiado. La hidrólisis se midió cuantificando la tirosina liberada por el método de Anson (40).

Se efectuó la correlación entre este método de evaluación y la determinación de nitrógeno proteínico en el sobrenadante analizado por microkjeldhal.

## 7. CARACTERIZACION DE LOS HIDROLIZADOS EN TERMINOS DE LA LIBERACION DE LA FENILALANINA.

### 7.1 DETERMINACION FLUOROMETRICA DE LA FENILALANINA.

Se utilizó este método como un primer acercamiento a la evaluación de la especificidad de las proteasas por fenilalanina. Con este procedimiento, descrito inicialmente por Mc Caman y Robins (47) para la determinación de fenilalanina en suero y plasma, se forma un compuesto fluorescente al reaccionar la fenilalanina con ninhidrina bajo condiciones que minimizan la contribución de otros constituyentes que también fluorescen con este reactivo. La respuesta fluorométrica se aumenta por la presencia del dipéptido l-leucil-l-alanina. El pH de la reacción debe ser controlado a  $5.8 \pm 0.1$  con un regulador de succinatos 0.6 M, con el fin de optimizar la fluorescencia y maximizar la especificidad. El método es el siguiente:

1. Se prepara el reactivo de trabajo que consiste de un regulador de succinatos 0.6 M, pH  $5.8 \pm 0.1$ ; ninhidrina 30 mM y del dipéptido l-leucil-l-alanina 5 mM en una proporción 10:4:2.

2. A 0.30 ml del reactivo de trabajo se le añade 20 microlitros de la muestra y se incuba por dos horas a  $60 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

3. Inmediatamente después se enfría en un baño de agua helada durante tres minutos.

4. Se adicionan 1.5 ml del reactivo de cobre (1.6 g de carbonato de sodio anhidro, 0.1 g de tartrato de sodio y potasio y 0.6 g de sulfato de cobre, diluidos en un litro de agua).

5. Se deja reposar la muestra aproximadamente 10 minutos.

6. Se ajusta el fluorómetro a cero y se registra la fluorescencia relativa del(os) patrón(es) y de cada muestra. La concentración de fenilalanina se determina contra una curva patrón de concentración de fenilalanina.

Dado que la reacción con ninhidrina es únicamente por el grupo alfa amino, la cantidad de fenilalanina que se detecte no será la total liberada como aminoácido libre, sino la que haya quedado con el grupo amino libre como consecuencia de la hidrólisis.

El fluorómetro usado fue un turner modelo 111. El filtro primario debe tener un pico de transmisión aproximado a los 365 nm (# 7-60) y la combinación de los filtros secundarios (# 2A +

65A) debe tener un pico de emisión entre los 450 y 535 nm.

## B. ANALISIS DE LA COMPOSICION DE AMINOACIDOS EN LOS HIDROLIZADOS POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (HPLC).

Para analizar la composición de los aminoácidos en las muestras se utilizó el método de cromatografía líquida de alta presión en fase reversa. El equipo usado fué un HPLC milipore waters, modelo 740, con una columna de fase reversa spherical c18, con un tamaño de poro de 5 micrómetros y de 15 cm de longitud (milipore No. de serie T 521310 D 12).

### 8.1 REACTIVOS.

El sistema de solvente (solventes A y B) empleado se elaboró de la siguiente manera : primero se preparó un regulador base, que consiste de 11.9 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y de 30.66 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  diluidos en un litro con agua de grado reactivo.

Solvente A.- Se preparó diluyendo 25 ml del regulador base en 500 ml con agua de grado reactivo.

Solvente B.- Se diluyeron 25 ml del regulador base con 200 ml de agua de grado reactivo y posteriormente se aforó a un litro con acetonitrilo.

El acetonitrilo y el metanol deben ser de grado hplc (Lichrosolvmerk). El agua usada en la preparacion de los solventes se destiló, desionizó y desgasifico. El agua, el metanol y el sistema de solventes (A y B) se filtraron a través de membranas de 0.45 micrómetros.

## 8.2 SEPARACION.

Los aminoAcidos se separaron utilizando un sistema de gradiente lineal con los solventes A y B durante 60 minutos bajo las siguientes condiciones :

Tiempo inicial (t = 0) : 15 % de solvente B / 85 % del solvente A.

Tiempo final (t = 60 min) : 75 % del solvente B / 25 % del solvente A.

Flujo de separación = 1.5 ml / min.

Columna a temperatura ambiente.

## 8.3 PREPARACION DE LOS DERIVADOS DE AMINOACIDOS.

Se prepararon derivados de aminoacidos, tanto de las muestras problema como de los patrones de aminoácidos. Se utilizó ortoftaldialdehido, con etanotiol como agente reductor : opz/etsh



A 0.5 ml de la mezcla patrón de aminoácidos o de la muestra problema se le añadieron 2.0 ml de metanol o de la solución de patrón interno y se centrifugó a 1200 X g por cinco minutos. A 0.2 ml de sobrenadante se le agregaron 2.0 ml de la mezcla de reacción (100 mg de OPA; 17.5 ml de metanol : 2.5 ml de regulador de boratos 0.5 M, pH = 9.5 y 100 microlitros etanotiol) para formar los derivados de aminoácidos. Antes de inyectar la muestra se pasa por filtros de 0.45 micrómetros. Los derivados de aminoácidos permanecen estables por cinco minutos.

La derivatización juega una parte importante en la detección de la fluorescencia y se usa para modificar compuestos con poca o ninguna fluorescencia así como para permitir una mayor sensibilidad y una mayor detección selectiva. Dado que la mayoría de los reactivos derivatizantes son no polares, la derivatización también puede tener el efecto de reducir la polaridad de las moléculas. El ortoftaldialdehído en solución alcalina y en presencia de un fuerte agente reductor (2-mercaptoetanol) reaccionan con el grupo amino primario de los aminoácidos y de los aminoazúcares (49).

## 9. EVALUACION DE LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS HIDROLIZADOS.

Se evaluó la estabilidad microbiológica, por cuenta en placa, de los hidrolizados que duraron más de diez horas en el proceso de hidrólisis. Se utilizó agar extracto de malta como medio sólido y se incubaron a 47 °C por 24 y 48 horas.

## V RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. SELECCION DE LA MATERIA PRIMA.

De las materias primas analizadas : leche en polvo descremada (LPD), caseinato, proteínas de soya, proteínas de pescado y gelatina, se seleccionó a la LPD como la mejor opción de sustrato base para la hidrólisis debido a que, como se mencionó anteriormente, cuenta con seguridad en el suministro (LICONSA) y es de bajo costo (5.7 US \$/kg de proteína).

En comparación con las proteínas de soya y de pescado (nacionales) la LPD es un sustrato que cuenta con un alto control de calidad y además, por no contener grasas se evita un paso previo al proceso de hidrólisis.

Cabe mencionar que tanto la LPD como el caseinato han sido ampliamente utilizados como base de hidrolizados para usos clínicos o dietéticos ya que, entre otras razones, no proporciona un sabor desagradable adicional al sabor amargo causado por efecto de la hidrólisis como es el sabor a pescado o a frijol en los hidrolizados a base de proteína de pescado y de proteína de soya respectivamente.

En comparación con el caseinato, la LPD cuenta con una mezcla de proteínas de alta calidad y presenta otros nutrimentos

que sería necesario agregar al producto final del hidrolizado de caseinato. Además contiene menos fenilalanina (4.75 g/100g de LPD) que el caseinato (5.24 g/100g de producto). Sin embargo, de presentarse problemas durante el procesamiento (microbiológicos o químicos) esta opción permite con relativa facilidad cambiar la materia prima por caseinato.

La gelatina a pesar de contener menos fenilalanina (2.33 g/100g de producto) que la LPD es una proteína muy pobre en los demás aminoácidos indispensables. En la práctica se podría utilizar en combinación con la LPD ya que se ha visto (50) que ayuda a disminuir los problemas de sabor amargo en los hidrolizados de leche.

## 2. CARACTERIZACION DE LA LECHE EN POLVO DESCREMADA.

Primeramente, al sustrato seleccionado se le determinó el contenido de proteínas, lípidos, cenizas y lactosa. En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos de estos análisis y se comparan con los reportados por la ADMI (51), LICONSA (52) y el INN (53), de donde se concluyó que no existen diferencias significativas con respecto a los análisis efectuados por estas dependencias.

Tabla 6. Análisis bromatólogico de la LPD (g/100g)

COMPONENTE	EXPERIMENTAL	ADMI	LICONSA	INN
proteína	35.05	36.0	34.0	33.7
lípidos	1.55	1.25	1.25	1.5
lactosa	52.0	51.0	53.0	47.2
humedad	3.5	4.0	4.0	
cenizas	7.9	8.2	8.0	

### 3. CORRELACION ENTRE LOS METODOS DE ANSON Y EL DE MICROKJELDHAL PARA EVALUAR EL DESARROLLO DE LA HIDROLISIS.

Con el fin de establecer una correlación entre los métodos de Anson y el de Microkjeldhal se realizaron hidrólisis de LPD con Amano-2A y HT-proteolytic 200 bajo las condiciones que se señalan en la figura 4. La evolución de la hidrólisis se siguió midiendo el porcentaje de nitrógeno solubilizado y los microgramos de tirosina por mililitro liberados. El coeficiente de correlación entre ambos métodos fue, para las dos enzimas, de 0.99 ( $p = 0.05$ ). Este hecho nos permite medir indistintamente tirosina liberada o bien nitrógeno soluble para describir la evolución de la reacción. La figura 4 puede ser usada como un

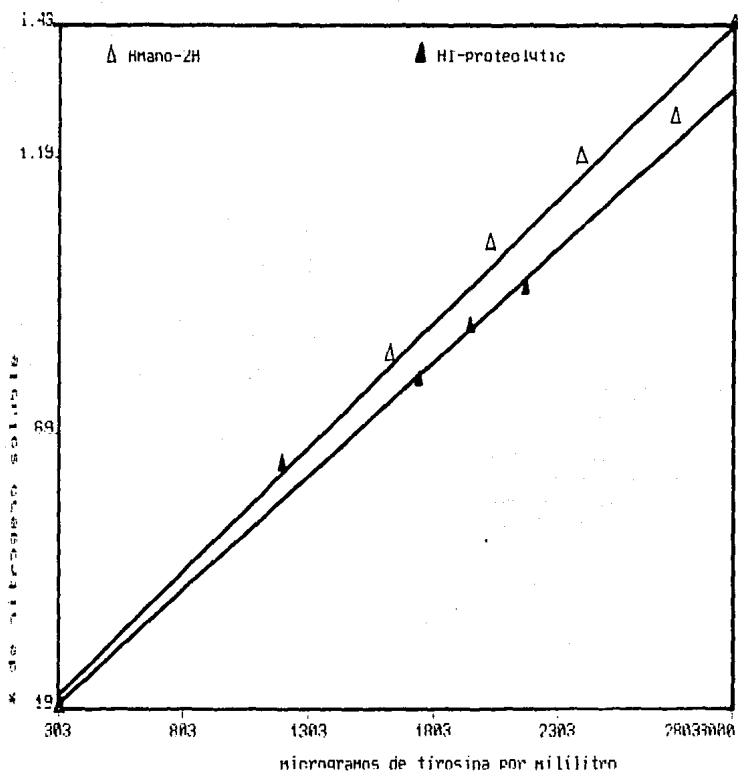


Fig 4. Correlación entre el metodo de microKjeldhal y el metodo de Anson para evaluar el desarrollo de la hidrólisis de las enzimas amano-2A(e/s=1%) y HI-proteolytic (e/s=2%).

patrón para la expresión del grado de hidrólisis en uno u otro terminos. En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 7. Comparación de los métodos de Anson y de Kieldhal para evaluar el desarrollo de la hidrólisis.

TIEMPO (Hrs)	AMANO-2A		HT-PROTEOLYTIC	
	% N SOLUBLE	µg TIR/ml	% N SOLUBLE	µg TIR/ml
0	0.19	303.4	0.17	303.4
1	0.83	1627.2	0.63	1198.8
2	1.03	2023.2	0.78	1746.0
3	1.19	2386.8	0.88	1947.6
4	1.26	2764.8	0.95	2163.6
5	1.43	3000.0		

Dado que se pensó que podría haber una correlación entre el grado de hidrólisis y la liberación de fenilalanina de las diferentes proteasas, se evaluó como primera instancia la liberación de tirosina, puesto que el método utilizado para la determinación de este aminoácido es más económico, más rápido y más accesible (el equipo) que el empleado para medir fenilalanina.

#### 4. SELECCION DE LA(S) ENZIMA(S).

Las proteasas comerciales probadas fueron Amano-2A, HT-protreolytic 200, papaina y proteasa N (ver especificaciones en la tabla 3).

##### A) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Antes de iniciar los experimentos de hidrólisis fue necesario definir la actividad enzimática de las enzimas, con el fin de conocer y comparar la actividad enzimática empleadas en cada experimento de hidrólisis, así como el costo real por unidad. En las figuras 5,6,7 y 8 se presenta la evolución de la reacción durante el período de velocidad inicial, en condiciones de saturación de sustrato con el fin de medir la actividad máxima ( $v/s = 0.5$  y  $1\%$ ). Finalmente en la tabla 8 se presenta la actividad para los cuatro productos enzimáticos y se demuestra que las dos concentraciones de sustrato empleadas se encuentran dentro de la zona de saturación de la enzima, en la cual la  $V_{max}$  es constante e independiente del sustrato. De la tabla 8 se puede concluir que la papaina es el producto de mas baja actividad y el producto Amano el de máyor. Sin embarco, la comparación debe en realidad efectuarse en términos de costo como se efectúa más adelante. Estos resultados permiten ya sea definir las dosis de enzima a emplear o bien explicar la diversidad de resultados



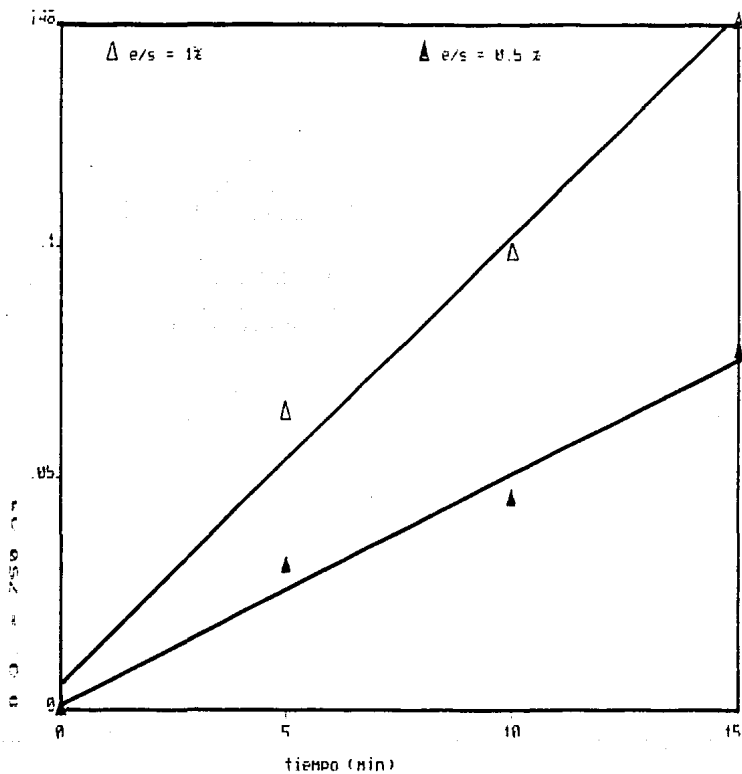


Fig 5. Evolución de la reacción de hidrólisis en LPD durante el periodo de velocidad inicial con paparna a dos concentraciones de e/s bajo las siguientes condiciones:  $|s| = 5\%$ ,  $ph = 6.0$  y  $t = 50^{\circ}C$ .

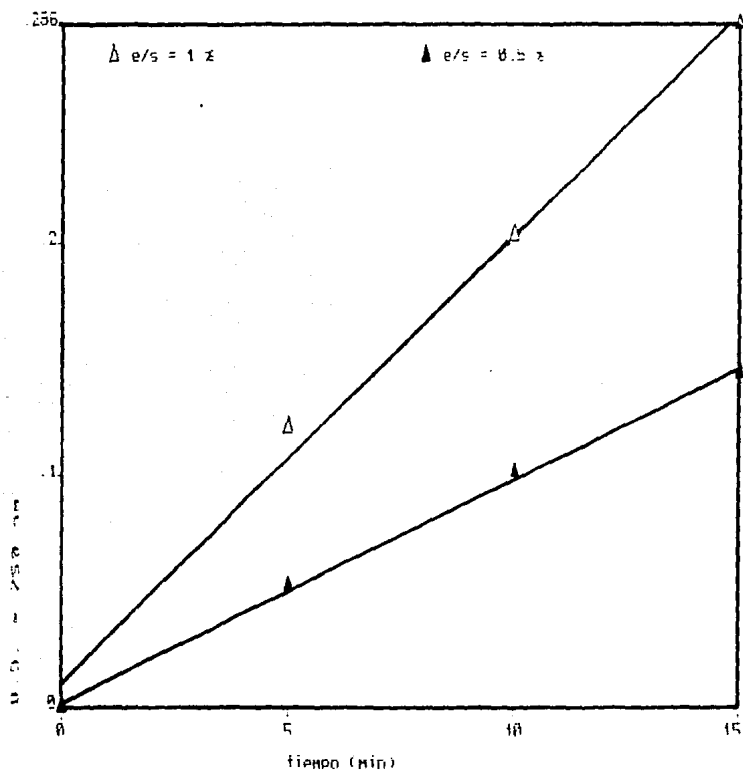


Fig 6. Evolucion de la reaccion de hidrolisis en LPD durante el periodo de velocidad inicial con H1 a dos concentraciones de e/s bajo las siguientes condiciones: [s] = 5%, pH = 6 y  $t = 50^{\circ}\text{C}$ .

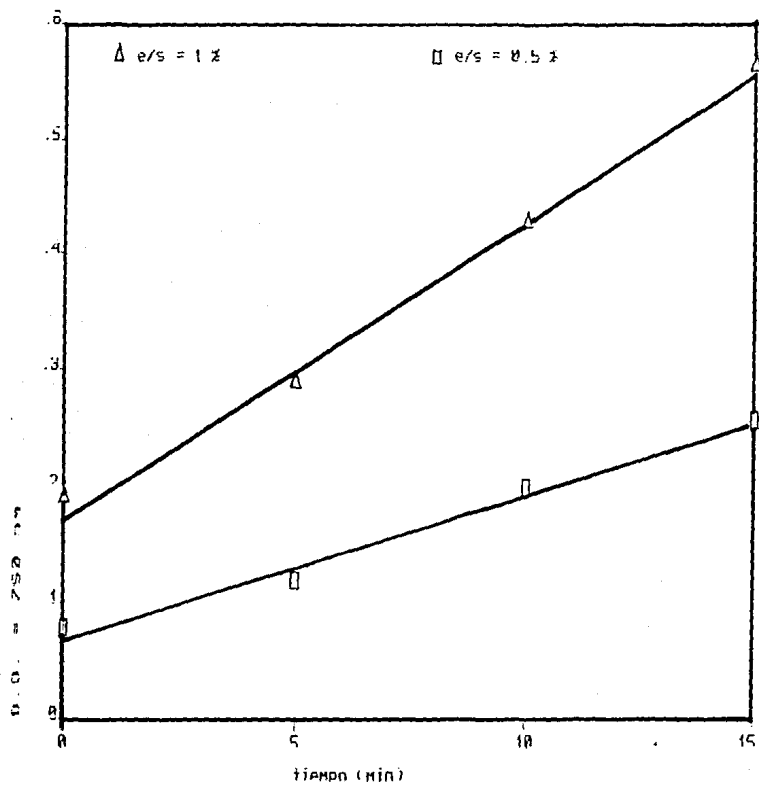


Fig 7. Evolución de la hidrólisis en LPD durante el periodo de velocidad inicial con Amano-2A a dos concentraciones de e/s bajo las siguientes condiciones: [S] = 5%, pH = 6 y T = 50°C.

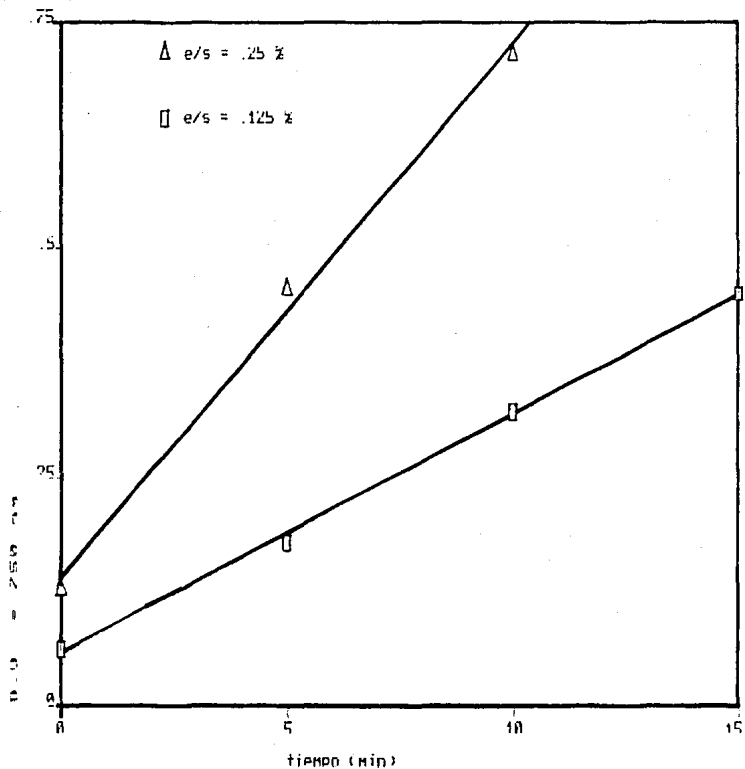


Fig 8. Evolución de la hidrólisis en LPD durante el periodo de velocidad inicial con proteasa N a dos concentraciones de e/s bajo las siguientes condiciones: [s] = 5%, pH = 6 y  $t = 50^{\circ}\text{C}$ .

obtenidos a las mismas dosis.

Tabla 8. Comparación de las velocidades iniciales, actividad específica y unidades de actividad de HT, papaina, Amano-2A, y proteasa N a dos concentraciones de e/s.

	V <sub>i</sub>		act. esp.		U/mo <sub>enz</sub>		act rel.*
	μg Aa/ml min		μg Aa/mo <sub>enz</sub> / min		μmol Aa/min		%
e/s g/l	0.05	0.025	0.05	0.025	0.05	0.025	
PROTEASA							
HT	18.9	9.8	42.0	44.0	0.23	0.24	9.7
papaina	9.5	5.0	21.1	22.3	0.12	0.12	4.84
Amano-2A	28.1	13.1	62.6	62.0	0.35	0.34	13.7
e/s g/l	0.0125	0.00625	0.0125	0.00625	0.0125	0.00625	
N	44.3	25.2	398.8	449.0	2.17	2.48	100

\* con respecto al más activo, es decir la proteasa N.

#### B) CONCENTRACION DE SUSTRATO.

Desde un punto de vista cinético es evidente que la selección de la concentración de sustrato debe caer dentro de aquel valor que permitiese la máxima expresión de la actividad enzimática sin embargo, desde un punto de vista de productividad, conviene trabajar a la máxima concentración posible de sustrato.

siempre y cuando no se presente un problema de inhibición de la enzima por exceso de sustrato. Tomando en cuenta estas consideraciones se seleccionó una concentración de proteína de 11 % correspondiente a 460 g/l de leche en polvo.

### C) HIDROLISIS DE PROTEINAS POR DIFERENTES PROTEASAS.

En la tabla 9 se presentan los resultados promedio de duplicados, en microgramos de tirosina por mililitro liberados con cada una de las proteasas empleadas en la hidrólisis de una suspensión de leche al 10 % de proteína durante cinco horas.

El pH no puede ser modificado libremente para no alterar la estabilidad de las proteínas en solución. Es por esta razón que se seleccionaron las proteasas ya mencionadas puesto que todas presentan una adecuada actividad al pH de la leche (pH = 6.5). Finalmente la temperatura se fijó en 50 °C ya que por un lado todas las proteasas presentan una buena actividad y por el otro, se asegura el control microbiológico del producto. En la figura 9 se grafican los resultados de la hidrólisis. En la tabla 10 se presentan las conclusiones derivadas de los resultados de la hidrólisis combinando efectos cinéticos con factores económicos. Por un lado todas las reacciones parecen detenerse a las cinco horas siguiendo un orden correspondiente a la dosis de actividad enzimática (mayor grado de hidrólisis a mayor actividad de la

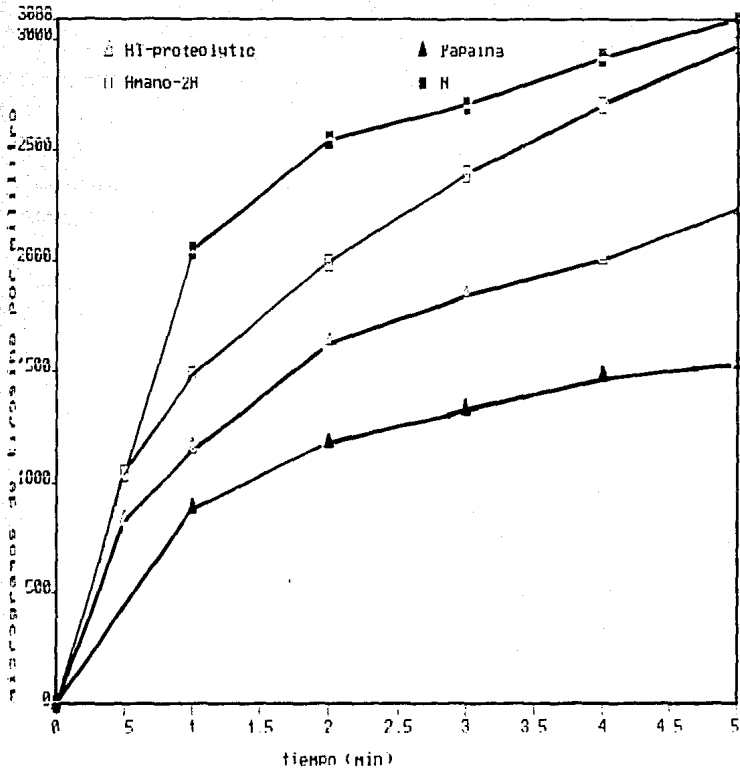


Fig 9. Evolucion de la hidrolisis de proteinas de la leche con las proteasas N, Amano-2A, HI y papaina durante 5 horas de reaccion a una concentracion de sustrato = 10%, pH = 6.3, l = 50°C y con agitacion constante.

enzima), aunque este comportamiento frecuente en la hidrólisis de proteínas se explica igualmente en términos de la especificidad de la enzima. De cualquier forma, la proteasa Amano-2A es en términos reales la que permite una mayor liberación de tirosina por unidad de actividad aunque en términos de costo es superada por la enzima HT-proteolytic, que a pesar de ser 3.3 veces más económica (por gramo de tirosina liberada) es al mismo tiempo 1.85 veces menos eficiente en la hidrólisis. Como una primera conclusión y de acuerdo a los criterios ya mencionados la proteasa Amano-2A parece ser la mejor enzima.

Tabla 9. hidrólisis de proteasas con diferentes proteasas.  
( $\mu$ g tir/ml)

tiempo (Hrs)	e/s g/l	PROTEASAS			
		HT 2%	Dapaina 2%	Amano-2A 1%	proteasa N 0.5%
0		303.4	n.d.	303.4	n.d.
0.5		828.0	n.d.	1047.6	n.d.
1		1151.3	878.4	1483.3	2048.4
2		1616.4	1180.8	1985.2	2545.2
3		1839.6	1328.4	2386.1	2700.0
4		1998.8	1468.8	2697.6	2916.0
5		2228.4	1522.8	2974.3	3088.8

n.d. = no determinado.



Tabla 10. caracterización de las enzimas proteolíticas en términos de liberación de tirosina.

	PROTEASAS			
	HT	PAPAINA	AMANO-2A	PROTEASA N
costo US \$/kg	10	40	100	250
actividad U/g enz	235	120	345	2325
% e/s g/100 g sust	2	2	1	0.5
e/s Uact/100g sust	4.7	2.4	3.5	11.6
ug tir/ml *	2228	1523	2974	3089
ug tir/mg enz *	114	760	2974	6180
ug tir/U *	4740	6333	8620	2659
US \$/g tir *	0.009	0.0525	0.0336	0.0405
US \$/k proteína tratada *	0.2	0.8	1.0	1.25

\* a las cinco horas de reacción

#### D) DETERMINACION POR FLUOROMETRIA DE LA FENILALANINA AMINO LIBRE.

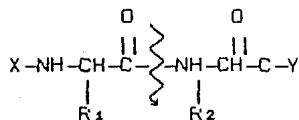
A los hidrolizados de leche obtenidos se les determinó la fenilalanina libre por el lado amino, ya fuera como residuo de aminoácido o como péptido ( tabla 11).

Para comprobar que no habría reacción con la fenilalanina unida por el lado amino se le hizo la determinación a una solución de aspartamo, observándose que no hubo reacción con este

grupo.

De la tabla 11 los resultados son evidentes. se observa que la proteasa Amano-2A presenta una alta especificidad por la fenilalanina en el lado amino.

Cuando se reporta la especificidad de enzimas proteolíticas, generalmente se hace con respecto a un modelo del tipo :



Donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> definen los aminoácidos del enlace péptido a hidrolizar. En el caso de la enzima Amano-2A es evidente que existe más requerimiento de fenilalanina en R<sub>2</sub>, lo cual resulta adecuado para los objetivos específicos de esta hidrólisis y refuerza la preselección efectuada por los resultados de la sección anterior. Eventualmente las demás proteasas podrían tener afinidad por la fenilalanina en el lado carboxílico (especificidad de fenilalanina en R<sub>1</sub>), lo que no puede demostrarse con este experimento.

Dado que con la proteasa Amano-2A se obtuvo el mayor desarrollo de la hidrólisis y la máxima liberación de NH<sub>2</sub>-FEN, se seleccionó como la enzima apartir de la cual se harían los demás experimentos de hidrólisis.

Tabla 11. Determinación por fluorometría de la fenilalanina amino libre.

	PROTEASAS			
	HT 2%	papaina 2%	Amano-2A 1%	proteasa N 0.5%
mg fen-NH <sub>2</sub>	3.14	2.90	28.34	4.03
mc fen-NH <sub>2</sub>	2.54	2.34	22.90	3.26
% fen-NH <sub>2</sub> libre *	5.35	4.93	48.21	6.86

\* del total de fenilalanina 47.5 m/q prot. (41)

En la figura 10 se muestra la correlación ( $r = 0.99$ ) que existe entre la tirosina liberada y la fenilalanina amino libre en la hidrólisis con Amano-2A. Este patrón puede servir en forma indirecta para seguir la evolución de la NH<sub>2</sub>-FEN durante las primeras cinco horas de hidrólisis.

##### 5. INACTIVACION DE LA ENZIMA AMANO-2A.

En la figura 11 se muestra un estudio efectuado para determinar las condiciones de desactivación de la enzima al término de la reacción. Dicho experimento consistió en seguir la evolución de una hidrólisis. Al término de la primera hora de reacción el medio se dividió en cuatro muestras, tres de las cuales fueron tratadas en ebullición por 5, 10 y 15 minutos

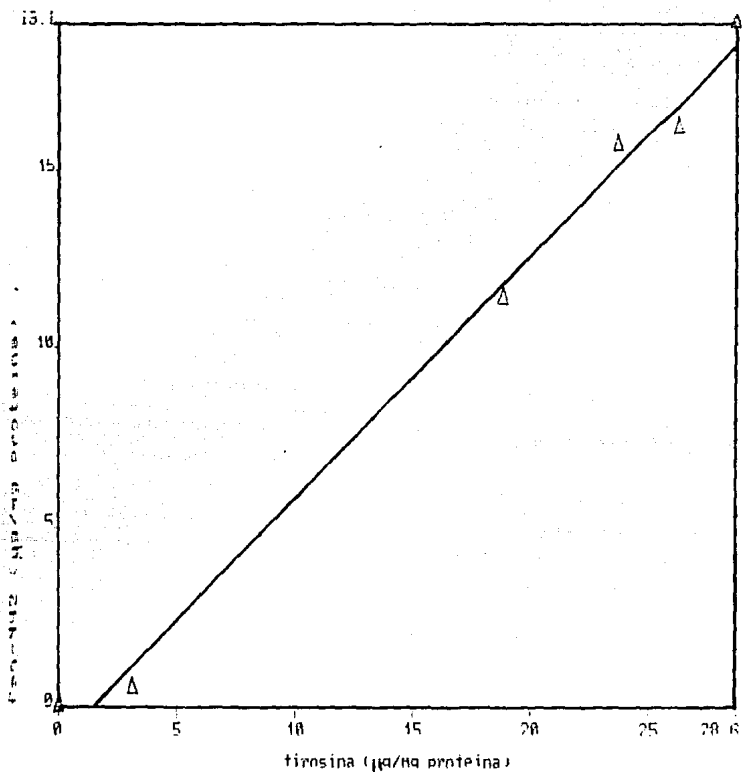


Fig 10. Correlación entre la fenilalanina- amino libre y la tirosina liberada durante 5 horas de hidrólisis con Amano-2A (e/s=1%) bajo las siguientes condiciones: [s] = 10%, pH = 6 y t = 50°C.

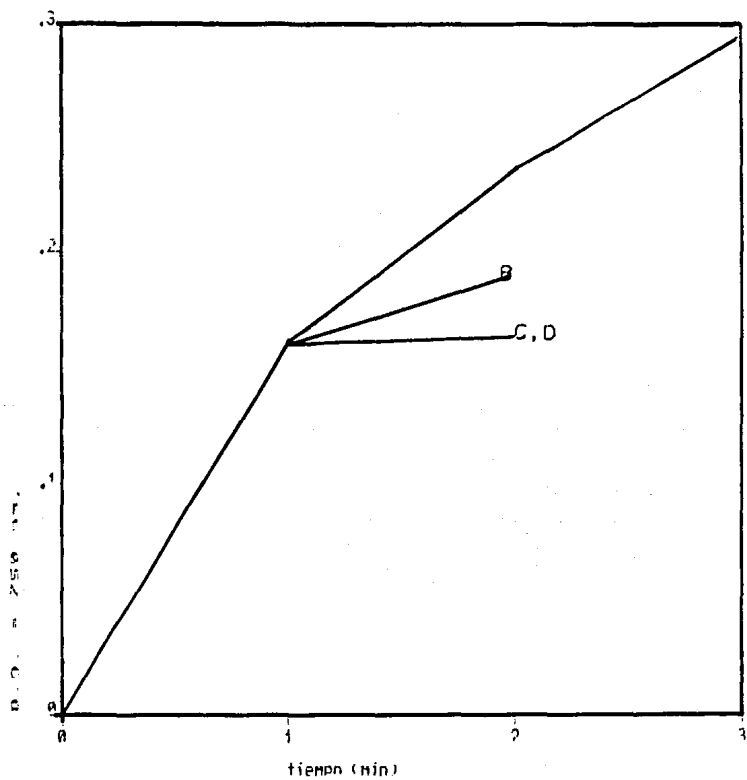


Fig 11. Inactivación de Amano-2A. Al término de 1 hora B, C y D fueron tratadas a 92°C por 5, 10 y 15 min respectivamente. ISI = 10% y pH = 6.3.

respectivamente. Posteriormente se restablecieron las condiciones de hidrólisis para determinar el grado de desactivación. De estos resultados es evidente que 10 minutos son suficientes para desactivar esta enzima proteolítica.

#### 6. EXPERIMENTOS DE HIDROLISIS CON MEZCLAS DE PROTEASAS.

Tomando en cuenta de que existe la posibilidad de una especificidad de las proteasas N, HT y papaina hacia fenilalanina en R<sub>1</sub>, la acción combinada de la enzima Amano-2A y una proteasa con este tipo de especificidad resultaría una mayor liberación de fenilalanina libre. Por esta razón se plantearon experimentos combinando la enzima Amano-2A con las otras enzimas proteolíticas:

Amano-2A (e/s 1 %) con HT (e/s 2%)

Amano-2A (e/s 1%) con papaina (e/s 2%)

Amano-2A (e/s 1%) con proteasa N (e/s 0.5%).

Cada hidrólisis se mantuvo por cuatro horas a pH 6.3 y a una temperatura de 50 °C.

La relación de e/s entre las proteasas se seleccionó con base en lo reportado comunmente en la literatura (13.27).

## A) DESARROLLO DE LA HIDROLISIS.

Los resultados de las hidrólisis se encuentran en la tabla 12 y en la figura 12 y permite concluir que en las mezclas, tanto la velocidad de hidrólisis como el desarrollo final de la misma son mayores que con enzima Amano-2A sola, tabla 9 y figura 9.

## B) DETERMINACION DE FENILALANINA AMINO LIBRE

La tabla 13 nos indica que al combinar Amano 2A con las demás proteasas no hay una acción sinérgica entre las proteasas para la liberación de fenilalanina amino, sino que el resultado obtenido no es considerablemente mayor que el obtenido con Amano-2A sola.

Tabla 12. hidrólisis de proteínas con mezclas de proteasas ( $\mu\text{g}$  tir/ml).

		PROTEASAS		
tiempo (Hrs)	e/s	Amano-2A/HT (1%-2%)	Amano-2A/papaina (1%-2%)	Amano-2A/proteasa N (1%-0.5%)
0.5		1445.8	1033.2	2208.9
1		2049.8	1436.4	2924.0
2		2908.8	2474.6	3672.0
3		3402.8	3034.8	4029.8
4		3691.4	3261.6	4164.5

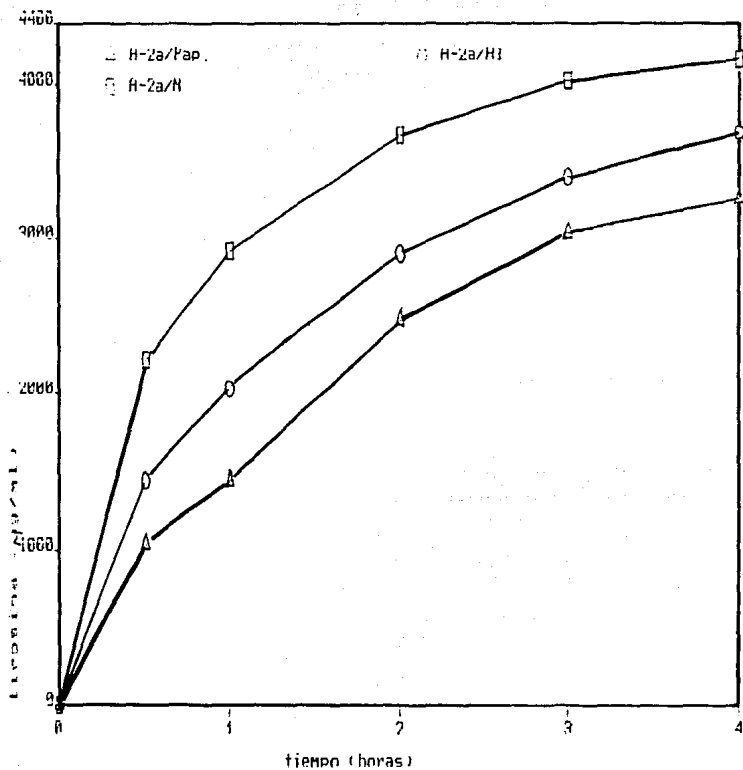


Fig 12. Hidrólisis de proteínas de la leche en mezclas de proteasas durante 4 horas de incubación. [S] = 10%, pH = 6.3, I = 50°C y agitación constante.



Tabla 13. fenilalanina libre obtenida en hidrolizados con mezclas de proteasas.

e/s	PROTEASAS			
	A-2A 1%	A-2A/HT (1%-2%)	A-2A/papaina (1%-2%)	A-2A/proteasa N (1%-0.5%)
<u>mg NH<sub>2</sub>-fen</u> <u>100 ml hid</u>	28.34	31.43	32.3	34.3
<u>mg NH<sub>2</sub>-fen</u> <u>g prot</u>	22.9	25.4	26.1	27.7
% NH <sub>2</sub> -fen libre *	48.2	53.5	55.0	58.3

\* fenilalanina total (FAO,41) = 47.5 mg/g proteina (41)

No obstante, si las proteasas N. HI y papaina no parecen tener afinidad por el lado amino de la fenilalanina, no se descarta con este experimento que la tuviesen por el lado carboxilico y que pudiera estar liberando residuos de fenilalanina que hayan sido previamente "cortados" en el lado amino por la proteasa Amano-2A. La única forma de demostrarlo es mediante la cuantificación de la fenilalanina libre por HPLC y su comparación con respecto a la obtenida con la enzima Amano-2A sola.

En la tabla 14 se efectúa un análisis de la conveniencia de agregar la segunda enzima a la misma dosis que en el primer análisis. Este estudio se efectúa solo en términos de tirosina

liberada y considerando el incremento alcanzado con respecto a los 2974  $\mu\text{g}$  de tirosina / ml logrados con la enzima Amano-2A sola. El costo por gramo liberada que se obtiene al añadir una segunda enzima en comparación a lo obtenido con Amano-2A (0.0336 US \$/g de tirosina) se ve aumentado 3.1 veces con la proteasa N, 0.83 veces con la enzima HT y hasta 8.3 veces con la papaína. Sin embargo, el efecto buscado es fundamentalmente la liberación de fenilalanina como aminoácido.

### C) CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS LIBRES.

Considerando las limitaciones de la cuantificación de la fenilalanina liberada por la técnica de fluorometría antes mencionada y con el fin de determinar si las mezclas de proteasa causarían una mayor liberación de residuos de fenilalanina, se sometieron muestras de hidrolizados al análisis de HPLC (ver en materiales y métodos).

A partir de las áreas de los derivados de aminoácidos usados como patrones (figura 13) se estimó la concentración de los aminoácidos liberados en la hidrólisis de proteínas con las proteasas Amano-2A, e/s 1 % (figura 14); Amano-2A, e/s 1% con HT, e/s 2 % (figura 15); Amano-2A, e/s 1 % con papaína, e/s 2 % (figura 16) y Amano-2A, e/s 1 % con la proteasa N, e/s 0.5 % (figura 17).

Fluorescencia relativa (uA)

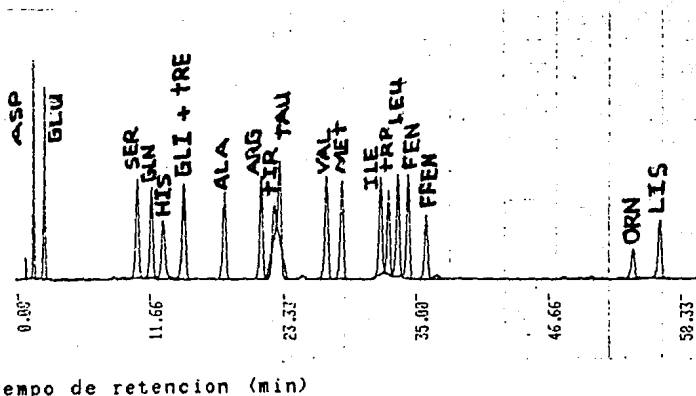


Fig 13. Cromatograma de los estándares de aminoácidos derivatizados. Se usó un sistema de fosfatos como solvente en columnas C-18 en fase inversa a temperatura ambiente y un flujo de separación de 1.5 ml/min (FFEN = FLUORFENILALANINA, estándar interno).

Fluorescencia relativa ( $\mu\text{A}$ )

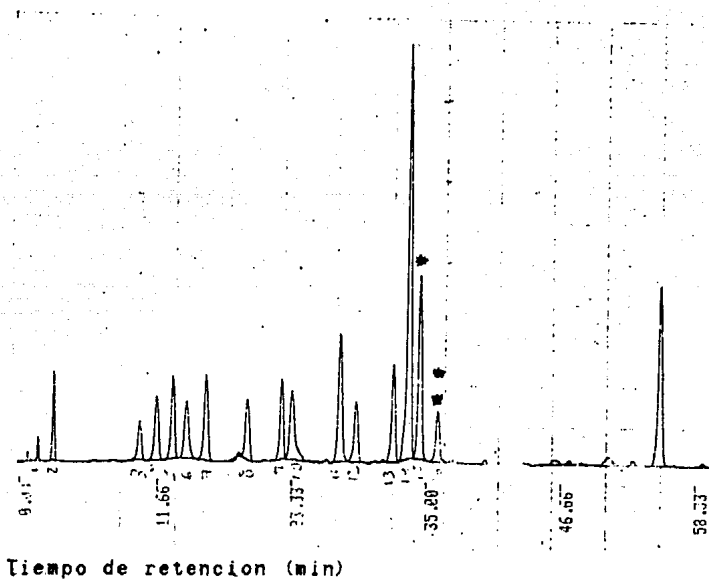
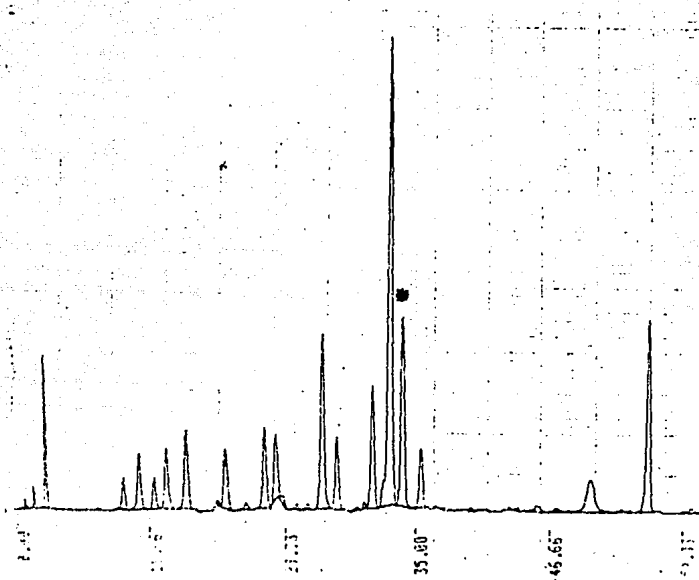


Fig 14. Cromatograma de un hidrolizado obtenido con Amano-2A (e/s=1%) durante 5 horas de incubación. Mismas condiciones que en la figura 13.

\* Fenilalanina

\*\* Estandar interno.

Fluorescencia relativa ( $\mu A$ )



Tiempo de retencion (min)

Fig 15. Cromatograma de un hidrolizado obtenido con la mezcla de Amano-2A/HT (e/s=1%/2%) durante 5 horas de incubación. Mismas condiciones que en la figura 13.  
x Fenilalanina.

Fluorescencia relativa ( $\mu A$ )

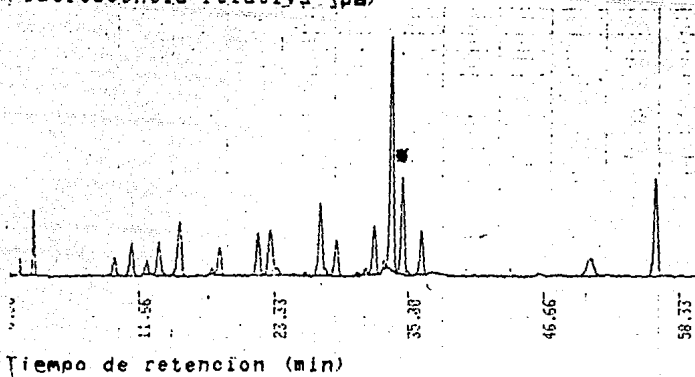
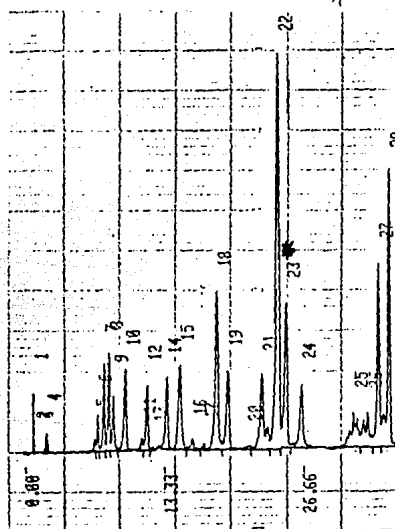


Fig 16. Cromatograma de un hidrolizado obtenido con la mezcla de Amano 2-A/papaína (e/s=1%/2%) durante 5 horas de incubación con las mismas condiciones que en la figura 13. \* Fenilalanina

Fluorescencia relativa ( $\mu A$ )



[Tiempo de retencion (min)]

Fig 17. Cromatograma de un hidrolizado obtenido con la mezcla de Amano-2A/proteasa N (e/s=1%/0.5%) durante 5 horas de hidrólisis. \* Fenilalanina

Tabla 14. Caracterización de las mezclas de enzimas en términos de liberación de tirosina.

	AMANO-2A		
	proteasa N 0.5 o/l	HT-proteolytic 2.0 o/l	papaína 2.0 o/l
unidades de actividad/l *	116	4.70	240
µg tir/ml **	1190	716.5	287.1
µg tir/mg 2a enzima	2380	358.3	143.6
µg tir/U 2a enzima	1023.7	1524.7	1196.7
US %/o tirosina **	0.105	0.0279	0.2786

\* añadidas de la segunda enzima

\*\* microgramos de tirosina adicionales liberados después del tratamiento con Amano-2A

En la tabla 15 se encuentran los resultados de los análisis efectuados en HPLC. En lo que toca a la fenilalanina liberada con las diferentes proteasas no se observó con respecto a la enzima Amano-2A, una mayor liberación de este aminoácido.

Por otro lado, con la mezcla de Amano-2A / HT se obtuvieron más residuos de tirosina y valina y con la mezcla de Amano-2A/N también aumentaron los residuos de tirosina, valina, metionina y especialmente los de leucina. Además se puede notar que hay una disminución en la liberación de glutamina con la mezcla de Amano-2A / HT y de ácido glutámico con la mezcla de Amano-2A / N.

Tabla 15. cuantificación de aminoácidos libres obtenidos en hidrolizados de LPD con diferentes tratamientos proteolíticos (mg Aa/g proteína).

aminoácido	PROTEASAS			
	A-2A	A-2A/HT	A-2A/papaina	A-2A/N
	e/s 1%	1%-2%	1%-2%	1%-0.5%
aso	0.08	0.09		
glu	2.82	4.08	2.7	0.90
ser	3.23	2.31	1.9	3.3
gln	6.9	2.1	1.1	6.0
his	6.6	5.7	4.7	5.0
gli+tre	7.0	5.7	6.2	7.4
ala	2.4	2.1	1.4	2.8
arg	5.6	5.1	6.0	6.2
tir	8.7	10.8	12.7	15.9
val	6.4	8.0	4.9	11.0
met	3.7	4.0	4.6	7.0
ile	5.4	6.0	5.3	6.4
tro	1.7	1.8	1.0	2.0
leu	22.5	24.4	16.0	34.3
fen	12.0	11.0	8.4	15.0
lis	17.5	17.0	13.0	

En la tabla 16 se compara la fenilalanina liberada entre la proteasa Amano-2A y la mezcla Amano-2A / proteasa N y se analiza el costo de la liberación en lo que a consumo de proteasas se refiere. Para liberar 15 mg de fenilalanina / g de proteína con



la mezcla respecto a los 12 mg de fenilalanina / g de proteína obtenidos con la enzima Amano-2A sola, se requiere aumentar el costo de las enzimas en 2.25 veces, por kg de proteína tratada. Incrementándose 12.5 veces el costo de gramo de fenilalanina liberada, pero aumentando en solo un 20 % su liberación.

Con estos experimentos, se logró liberar aproximadamente el 21 % de la fenilalanina total cuantificada por hidrólisis ácida de la materia prima ( tabla 17).

Tabla 16. Caracterización de la enzima Amano-2A v de la mezcla Amano-2A/proteasa N en términos de liberación de fenilalanina.

	Amano-2A	Amano-2A/prot. N
actividad ug/g enz.	345	2.670
µg fen liberada/ml	1.200	1.500
µg fen (lib)/mg enz.	1.200	1.000
mg fen (lib)/o prot.	12	15
µg fen/u	3.478	374.5
US \$/g fen	0.083	1.033
US \$/g prot. tratada	1.00	2.25

a las cinco horas de reacción.

Tabla 17. Cuantificación de aminoácidos totales en la LPD.

Aa	mg/g PROT	Aa	mg/g PROT
asp	83.4	tir	64.7
glu	203.3	val	63.6
ser	72.1	met	17.5
gli-tre	150.7	ile	55.4
ala	35.4	leu	113.9
arg	47.7	fen	53.9
lis	71.5		

hidrólisis ácida con HCl 6N desgasificado durante 24 horas de reacción.

#### 7. OPTIMIZACION DE LA HIDROLISIS DE PROTEINAS CON LA PROTEASA AMANO-2A.

Con base en los estudios anteriores se confirmó la selección de la enzima Amano-2A dado que presenta la mayor capacidad de liberar fenilalanina.

##### A) HIDROLISIS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AMANO-2A.

Se probaron diferentes concentraciones de enzima (e/s) a pH 6.3 y a 50 °C durante cinco horas de hidrólisis. En la tabla 18 y en la figura 18 se observa que tanto la velocidad inicial como el

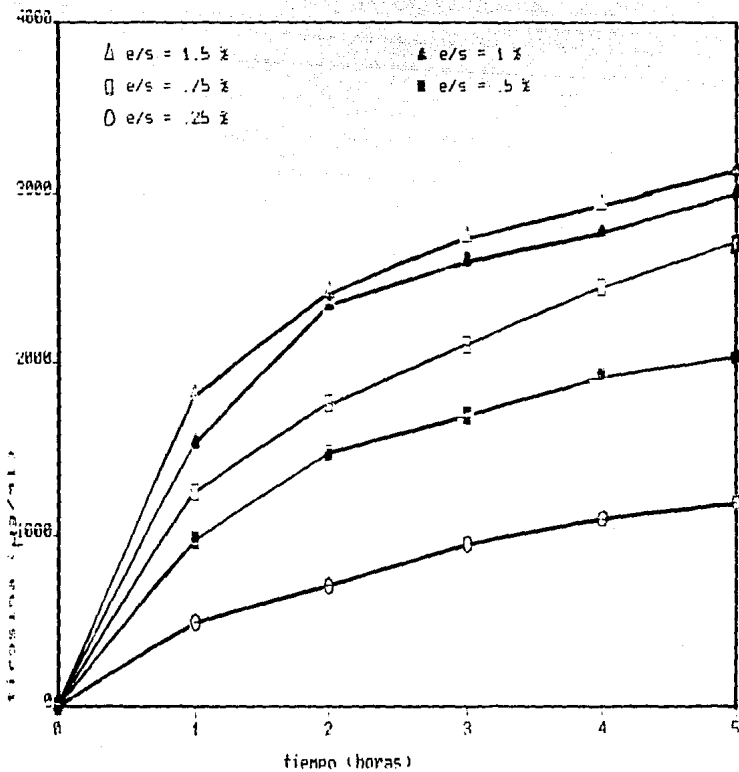


Fig 18. Desarrollo de la hidrólisis de las proteínas de la leche con diferentes concentraciones de Amano-2A durante 5 horas de incubación. [s] = 10%, pH = 6.3, T = 50°C y agitación constante.

grado de hidrólisis se incrementan considerablemente al aumentarse la concentración de enzima. Sin embargo, del análisis de estos datos se observa que por un lado para alcanzar el grado de hidrólisis que se obtienen con  $e/s = 1 \%$  se requerirían tiempos considerablemente más largos aún para  $e/s = 0.75 \%$  : por otro lado un incremento a  $e/s = 1.5 \%$  no mejora sensiblemente el grado de hidrólisis obtenido a la cinco horas de reacción. Por esta razón la relación enzima-sustrato se fija en  $1 \%$ .

En la figura 19 se presentan las velocidades iniciales obtenidas para diversas relaciones e/s. Estos estudios se efectuaron midiendo la producción de tirosina soluble en atca durante los primeros quince minutos de reacción.

En esta gráfica se observa que existe en el intervalo de concentración de enzima analizado (para 50 g/l de caseína) una relación lineal entre concentración de enzima y velocidad de reacción, lo que resulta en una actividad específica de  $51 \mu\text{g}$  tir/min mg de producto enzimático.

#### B) EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA VELOCIDAD DE REACCION DE LA PROTEASA AMANO-2A.

Se realizaron pruebas de hidrólisis durante una hora con la proteasa Amano-2A ( $e/s = 1\%$ ) a diferentes temperaturas de reacción : 20, 30 ,40, 50, 60 y 70 °C . Estos resultados se

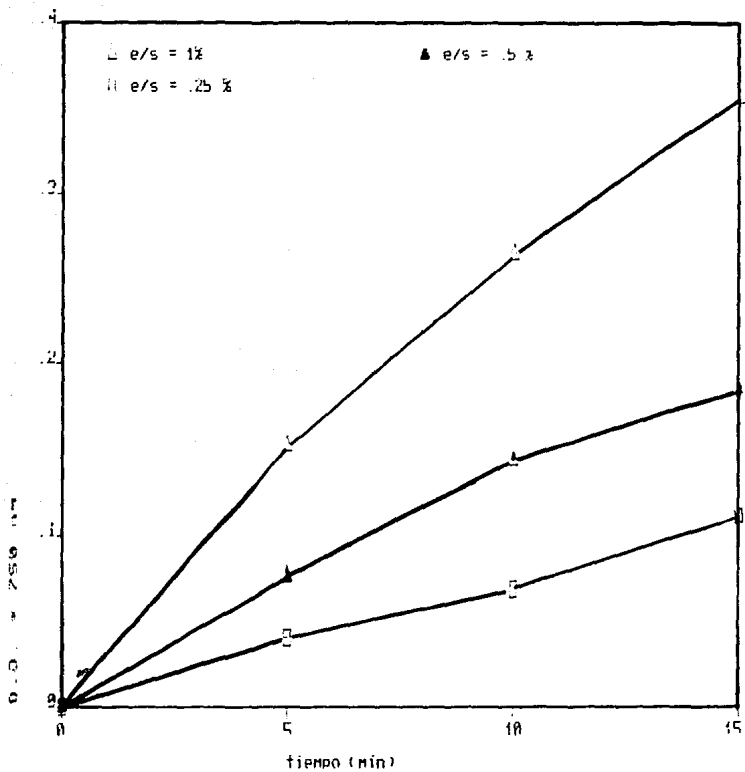


Fig 19A. Velocidad inicial obtenida en función de la concentración de la enzima Amano-2A. [s] = 10%, pH = 6.3, T = 50°C y agitación constante.

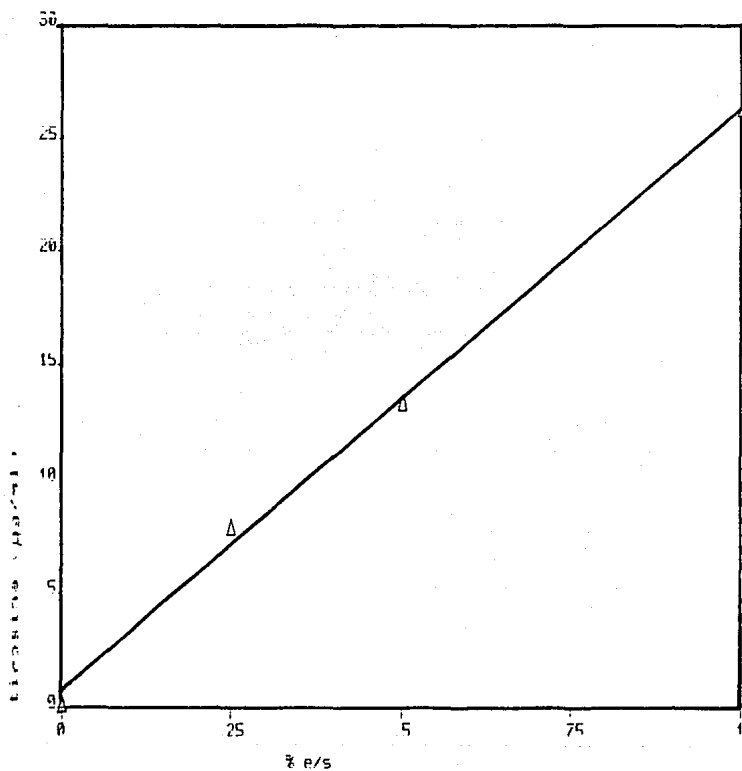


Fig 19B. Velocidad inicial obtenida en función de la concentración de la enzima Amano-2A. [S] = 10%, pH = 6.3, T = 50°C y agitación constante.

presentan en las figuras 20 para las velocidades iniciales  $v_0$  y 21 para la actividad en función de la temperatura. Se observa que la disminución a 70 °C es pequeña, lo que pone de manifiesto la alta termoestabilidad de la proteasa.

Tabla 18. hidrólisis de proteínas a diferentes concentraciones de Amano-2A ( $\mu\text{g}$  tir/ml).

T (Hrs)	% e/s				
	0.25	0.5	0.75	1.0	1.5
1	493.9	972.7	1263.6	1540.4	1821.6
2	703.4	1478.9	1774.8	2337.8	2416.7
3	950.4	1705.7	2100.6	2604.2	2737.8
4	1093.7	1920.6	2451.2	2759.8	2932.6
5	1192.3	2031.5	2710.4	2994.5	3128.0

De estos resultados es evidente que hay un incremento en la velocidad de reacción como respuesta a un aumento de la temperatura, alcanzando el óptimo a los 60 °C. A esta temperatura se observaron algunos cambios físicos durante la hidrólisis, probablemente debido a termocoagulación de la proteína, dada la alta concentración de sustrato (10 %). Por esta razón se decidió continuar las hidrólisis a 50 °C.

El efecto cinético de la reacción se puede describir por la ley de la Arrhenius (54,55).

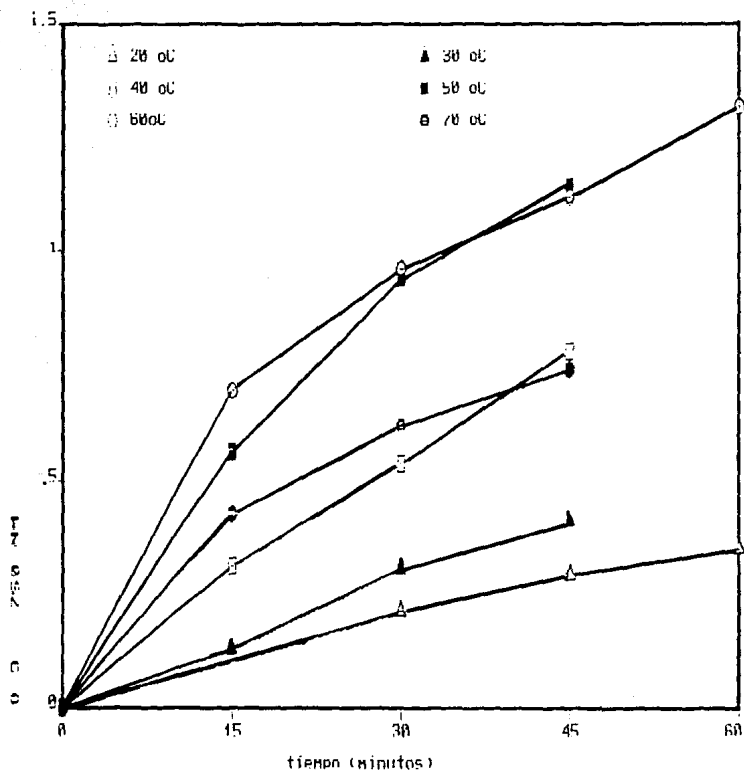


Fig 20. Efecto de la temperatura en la evolución de la hidrólisis en la LPD con Amano-2A, e/s = 1%, [S] = 10% y pH = 6.1 con agitación constante.



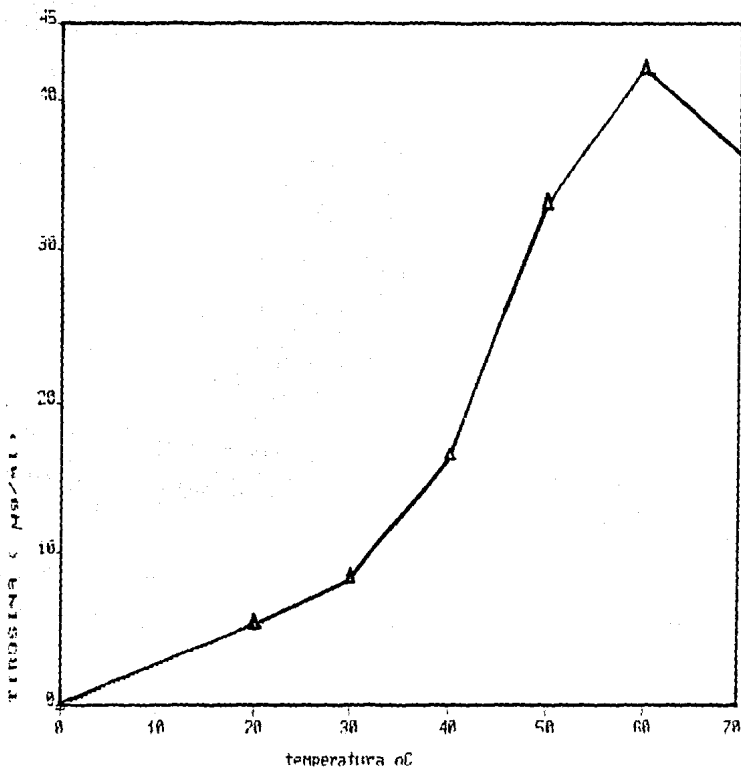


Fig 21. Efecto de la temperatura de reacción de la velocidad inicial de Amano-2A. e/s = 1%, [S] = 10% y pH = 6.1 con agitación constante.

$$K = A \text{ EXP}(-E_A/rt)$$

donde :

K = constante de velocidad de reacción

R = Constante universal de los gases

T = temperatura en °K

E<sub>A</sub> = energía de activación característica de cada enzima

A = constante

Si se grafica el log de V<sub>i</sub> en función de 1/T, la pendiente es igual a la energía de activación de la enzima dividida por R. En la figura 22 se grafican los valores correspondientes. De donde se concluye que el valor de la energía de activación obtenido para la proteasa Amamo-2A es de 10,688 cal/mol.

#### C) EFECTO DE LA CONCENTRACION DE SUSTRATO EN LA VELOCIDAD INICIAL DE LA HIDROLISIS CATALIZADA POR AMAMO-2A.

Se realizaron hidrólisis con diferentes concentraciones de proteína de la LPD : 1.93, 4.3, 7.7, 14.8, 18.5 y 31.3 g/l. manteniendo constante la concentración de enzima (e/s = 0.225 g/l) a un pH 6.0 a y 50 °C. En la figura 23 están graficados los resultados obtenidos, en donde encontramos que la velocidad inicial varía con la concentración de sustrato. En la figura 24 se grafican los valores de velocidad inicial en función de la concentración de sustrato, donde se observa que la reacción puede

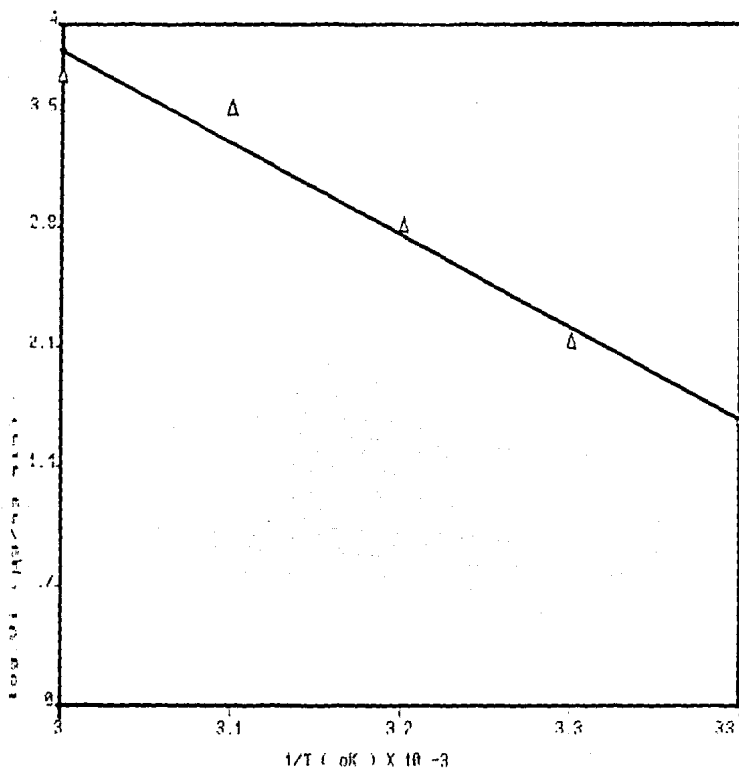


Fig 22. Gráfica de Arrhenius para la determinación de la energía de activación en la reacción catalizada por la enzima Amano-2A. e/s = 1%, [S] = 10% y pH = 6.1 con agitación constante.

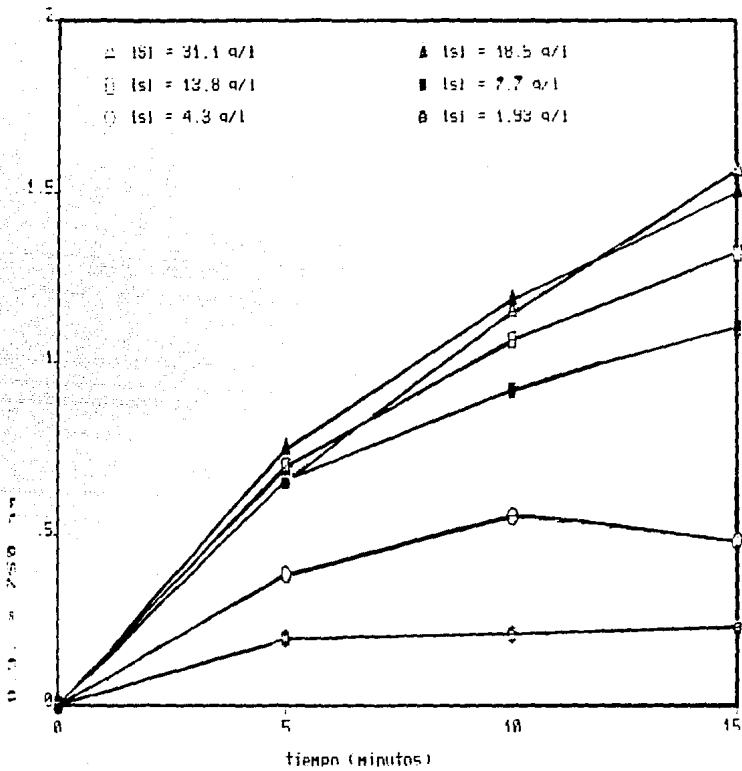


Fig 23. Efecto de la concentración de sustrato (g/l) en la velocidad inicial de reacción de Amano-2A. e/s = 1%, pH = 6.0, T = 50°C y agitación constante.

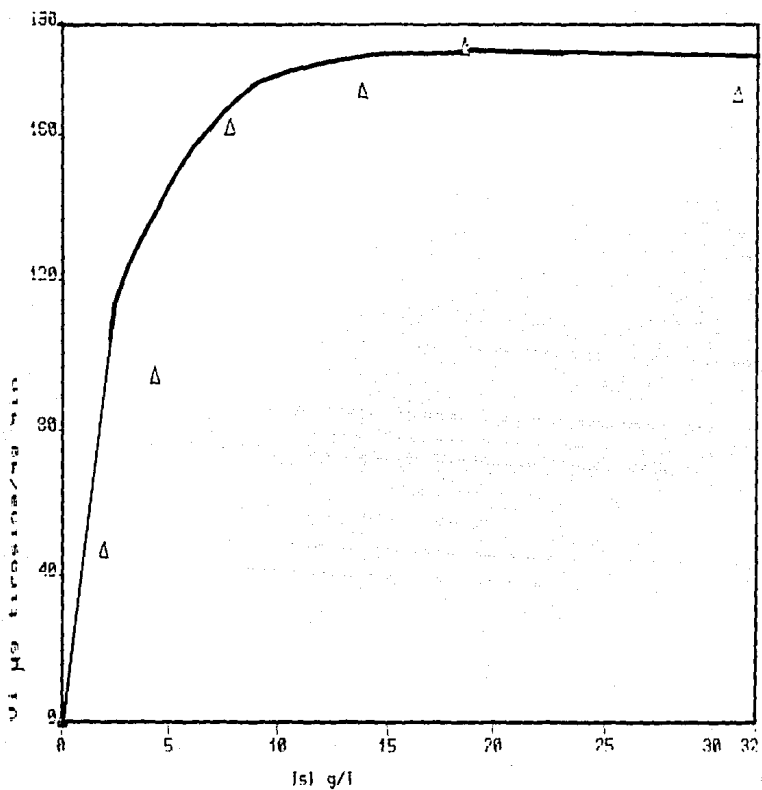


Fig 24. Cambio en la velocidad inicial de Amano-2A. ( $e/s=0.225$  g/l) en función de la concentración de sustrato. pH = 6.0,  $t = 50^{\circ}\text{C}$  y agitación constante.

ser descrita por el modelo de Michaelis-Menten. En esta figura se aprecia que a valores menores al 1 % de sustrato, la velocidad inicial de la reacción es directamente proporcional a la concentración de sustrato. Esto significa que en los experimentos de hidrólisis realizados, donde  $[S] = 10$  y  $5\%$  de proteína, la reacción es de orden cero respecto al sustrato. Es decir, que  $V_{max}$  es independiente de la concentración de sustrato por ubicarse en la zona de saturación.

En la figura 25 se representa gráficamente  $1/V_0$  en función de  $1/[S]$  (Lineweaver-Burk), de donde se concluye que  $V_{max}$  es igual a  $291.29$  y  $K_m$  es de  $0.98\%$ .

#### 8. EXPERIMENTOS DE HIDROLISIS CON LAS PROTEASAS AMANO-2A Y PRONASA, EN UN PROCESO DE DOS ETAPAS.

Dado que únicamente se logró liberar el  $21\%$  de la fenilalanina total con la proteasa Amano-2A, siendo este el mejor resultado obtenido con las proteasas analizadas, se decidió incrementar el grado de hidrólisis con la ayuda de una segunda enzima. Para este fin se introdujo la enzima pronasa. Se trata de una mezcla de enzimas proteolíticas de *Streptomyces griseus*, que contiene una exopeptidasa y es empleada frecuentemente en alimentos. Se efectuó este problema con el fin de saber hasta que

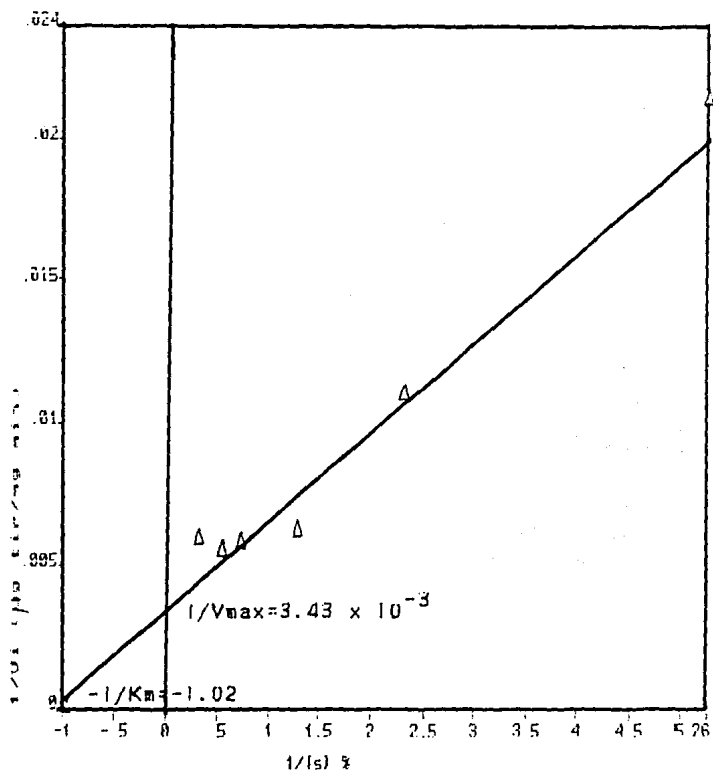


Fig 25. Gráfica doblemente recíproca de  $1/v$  en función de  $1/s$  de la hidrólisis catalizada con Amano-2A ( $e/s = 0.225$  g/l).

grado de hidrólisis es posible llegar con un proceso enzimático, ya que no tiene ninguna posibilidad de aplicación comercial dado su alto costo : \$ 20,800 US/kg (SIGMA).

#### A) DESARROLLO DE LA HIDROLISIS.

Se realizó la hidrólisis en dos etapas : primero se hidrolizó la LPD [S] = 10 % con la enzima Amano-2A (e/s = 1 %) a pH 6.5 y 50 °C durante 5 Hrs. y posteriormente se siguió con pronasa al mismo pH y 40 °C por 5 Horas más, antes de añadir la segunda enzima que inactivó térmicamente la enzima Amano-2A.

Es conveniente señalar que la hidrólisis con pronasa se efectuó a pH de 6.5 ya que Narahashi (56) reporta que a este pH la actividad de las exopeptidasas prevalece sobre las de endoproteinasas.

Con el fin de encontrar y seleccionar las mejores condiciones de hidrólisis en la que la pronasa libera el máximo de fenilalanina se evaluaron las siguientes variables : concentración de enzima, pH y temperatura de reacción para la pronasa. El tiempo de hidrólisis se alargó en todos los experimentos a 24 horas de reacción con la pronasa, para permitir una mayor expresión de la actividad exopeptidasa, ya que en la pronasa es menor en proporción a la actividad endopeptidasa.



Se probaron diferentes concentraciones de pronasa y se observó el efecto de la dosis en la reacción con el fin de explorar la factibilidad de emplearla en dosis bajas. En la tabla 19 se presentan estos resultados.

Tabla 19. efecto de la dosis de pronasa en la liberación de fenilalanina \*.

	% DE PRONASA e/s			
	0.75	0.5	0.25	0.1
mq fenilalanina liberada/g proteína	27.6	26.7	22.5	19.0

\* adicionada después de 5 Hrs de reacción con Amaro-2A. la fenilalanina se midió por hplc.

La dosis de 0.1 % e/s puede ser adecuada según se demostró en experimentos adicionales si se incrementa el pH hasta 7.4 (en oposición a lo reportado por Narahashi, Y.) donde se obtuvieron 27.6 mq de fenilalanina liberada por gramo de proteína. Estos experimentos demuestran la viabilidad del proceso con pronasa si se lograsen disminuir los costos de la exopeptidasa o bien se pudiese implementar un sistema de hidrólisis con la mezcla de proteasas inmovilizadas. Sin embargo, para efectos de este proyecto, por ahora la combinación no resulta adecuada desde el punto de vista económico.

## 9. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS HIDROLIZADOS.

Se evaluó la estabilidad microbiológica de los hidrolizados obtenidos con la mezcla Amano-2A y Pronasa a las 24 horas de reacción y se observó, por cuenta en placa (en agar extracto de malta), que si hubo contaminación microbiana después de las 10 horas de hidrólisis ; por lo que se optó realizar las hidrólisis siguientes con benzoato de sodio al 0.1 % .

## CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer las bases para la primera etapa del proceso de producción de un alimento proteínico bajo en fenilalanina .

Se seleccionó como sustrato la leche en polvo descremada tanto por su disponibilidad y costo como su valor nutricional. De presentarse algún problema en el proceso , ya sea en la hidrólisis o en la separación de la fenilalanina, esta opción permite con relativa facilidad cambiar la materia prima por caseinato, con el que se obtienen resultados similares (57).

Se evaluaron cuatro preparaciones de enzimas proteolíticas : proteasa Amano-2A, proteasa N. HT-proteolytic 200 y papaína ; primero en base al grado de hidrólisis ( nitrógeno proteínico soluble) y posteriormente en términos de su especificidad para la liberación de fenilalanina. Se llegó a la conclusión de que una sola enzima no permite obtener niveles de liberación suficientes para la implementación de la segunda etapa. Sin embargo, se preseleccionó a la enzima Amano-2A ya que además de ser la más eficiente en la hidrólisis (mayor liberación de tirosina por unidad de actividad), es con la que se logra el nivel superior de fenilalanina libre : 12 mg fenilalanina / gramo de proteína, que corresponde al 21 % del total (medido por HPLC).

Las condiciones establecidas para la hidrólisis con Amano-2A son:

S = 10 % ; e/s = 1 % ; pH = 6.0 ; T = 50 °C y  
agitación constante.

Se decidió emplear mezclas de proteasas con respecto Amano-2A y aunque el grado de hidrólisis fue mayor, la fenilalanina no aumentó considerablemente. Siendo la mejor combinación la de Amano-2a con la proteasa N : 15 mg fenilalanina / g de proteína.

Se optó por recurrir a una enzima con actividad de exopeptidas. Entre estas, la mas conocida y de mayor disponibilidad es la pronasa. Las condiciones óptimas de reacción de esta enzima son : e/s = 0.1 % ; pH = 7.4 ; T = 40 °C y tiempo de reacción = 24 Horas

En combinación con la Amano-2A, se alcanzó a liberar 27.6 mg de fenilalanina / g de proteína, que equivale al 51.0 % de la fenilalanina total. Para los fines del proyecto, esta combinación no resulta adecuada desde el punto de vista económico aunque si es apropiada para emplearse como base de la segunda etapa del proyecto o sea para la separación de la fenilalanina.

Este trabajo fue desarrollado en forma paralela con la segunda etapa, (separación de fenilalanina : 57), por lo que los resultados fueron inmediatamente incorporados a esta. En su

conjunto, el proyecto fue terminado exitosamente habiendo sido una importante conclusion del proceso de separacion, el que la eliminacion de fenilalanina en di y tripeptidos es considerable. Por esta razon no fue necesario recurrir a exopeptidasas, sino solamente incrementar la hidrolisis lograda con Amano-20 con una de las alternativas analizadas en este trabajo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Nyhan, W.L. 1984. Abnormalities in amino acid metabolism. En Clinical Medicine. Appleton-Century-Crofts. p. 129. USA.
2. Rain, D.N. 1974. The treatment of inherited metabolic disease. p. 1-23. American Elsevier Publishing CO.. New York.
3. Stanbury, J.B. 1983. The metabolic basic of inherited disease. 5th edition, Mc Graw-Hill Book CO., USA.
4. Dorothy, E.M. 1974. Diets for sick children. 3th edition. P. 283-290. Blackwell Scientific Publications. Great Britain.
5. Comitee on Nutrition. 1976. Special diets for infants with inborn errors of amino acid metabolism, pediatrics. 57:5.
6. Nashef, A.S., et al. 1977. Effects of alcali on proteins. disulfides and products, J. Agric. Food Chem.. 25:2. P. 245-250.
7. Adibi, S.A. 1971. Intestinal transport of dipeptides in man : relative importance of hydrolysis and intact absorcion. J. Clin. Invest.. 50, p. 2266-2275.

8. Adler-Nissen, J. 1977. Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochem.*, 12:4, P. 18.
9. Adler-Nissen, J. 1976. *J. Agric Food Chem.* 24, P. 1090.
10. Adler-Nissen, J. 1986. Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, USA.
11. Segel T.H. 1976. *Biochemical calculations*, 2nd edition, p. 214-233. John Wiley and Sons, USA.
12. Rupley J.A. 1967. Susceptibility to attack by proteolytic enzymes. *Meth. enzymol.* 11, p. 905-917.
13. Adler-Nissen J. 1978. Enzymatic hydrolysis of soy protein for nutritional fortification of low pH food. *Ann. Nutr. Alim.* 32, p. 205-216.
14. Ottesen, M. 1956. The conversion of ovalbumin into plakalbumin, as followed in the pH-Stat. *Arch. Biochem. Biophys.* 65, p. 70-77.
15. Cheftel, C., Aherm, M., Wand, D.I.C., Tannenbaum, S.R. 1971. Enzymatic solubilization of fish protein concentrate : Batch studies applicable to continuous enzyme recycling processes. *J. Agric. Food Chem* 19, p. 155-161.

16. Steinhardt, J., Beychok, S. 1964. Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules. In : The proteins (Neurath, H., ed.), Academic Press, New York. Vol II, p. 139-140.
17. Jacobsen, C.F., Léonis, J., Linderstrom-Land, K., Ottesen, M. 1957. The pH-Stat and its use in biochemistry. Meth. Biochem. Anal. 4, p. 171-210.
18. Murray, T.K. 1952. Studies on protein hydrolysis. I-preliminary observations on the taste of enzymic protein-hydrolyzates. J. SCI. Food Agric. 3, n. 470-475.
19. Matoba, T., Hayashi, R., Hata, T. 1970. Isolation of bitter peptides from tryptic hydrolyzate of casein and their chemical structure. Agric. Biol. Chem. 34, p. 1235-1243.
20. Gordon, Jr., D.F. Speak, M.L. 1965. Bitter peptide isolated from milk cultures of streptococcus cremoris. Appl. Microbiol., p. 537-542.
21. Kirimura, J. et al. 1969. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuff. J. Agric. Food Chem. 17, p. 689-695.



22. Matoba, T., Hata, T. 1972. Relationship between bitterness and of peptides and their chemical structures. *Agric. Biol. Chem.* 36, p. 1423-1431.
23. Helbig, N.B., et al. 1980. Debittering of skim milk hydrolyzates by adsorption for incorporation into acidic beverages. *J. Food. Sci.* 45, p. 331-335.
24. Ma, C.-Y., et al. 1983. Production of non-bitter, desalted milk hydrolyzate for fortification of soft drinks and fruit juice. *J. Food. Sci.* 48, p. 897-899.
25. Roland, J.F., et al. 1978. Hydrophobic chromatography : debittering protein hydrolyzates. *J. Food Sci.* 43, p. 1491-1493.
26. Lalasidis, G. 1978. Four new methods of debittering protein hydrolyzates with high content of essential amino acids. *Ann. Nutr. Alim.* 32, p. 709-723.
27. Fujimaki, M., Yamashita, M. Arai, S., Kato, H. 1970. Plastein reaction. it's application to debittering of proteolyzates. *Agric. Biol. Chem.* 34, p. 483-484.
28. Horowitz, J., Haurowitz, F. 1959. Mechanism of plastein formation. *Biochem. Biophys. Acta* 33, p. 231-237.

29. You-Shang, Z. 1983. Enzymatic synthesis of proteins and peptides. Trends Biochem. Sci. January 1983, p. 16-17.
30. Fujimaki, M., Arai, S., Yamashita, M. 1977, Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. Adv. Chemistry Ser. 160, p. 156-184.
31. Gololobov, M.Y., Belikov, V.M., Vitt, S.V., Paskonova, E.A., Titova, E.F. 1981. Transpeptidation in concentrated solution of peptic hydrolysate of ovalbumin. Nahrung 25, p. 961-967.
32. Hoften, Von, B., Lalasidis, G. 1976. Protease-catalized formation of plastein products and some of their properties. J. Agric. Food Chem. 24, p. 460-465.
33. Arai, S., Aso, H., Kimura, H. 1983. An enzymatically modified protein produced with covalent incorporation of L-methionine for use in nutritional improvement of soy protein. Agric. Biol. Chem. 47, p. 2115-2117.
34. Noguchi, M., Yamashita, M. Arai, S., Fujimaki, M. 1975. On the bittermasking activity of a glutamic acid-rich oligopeptide fraction. J. Food Sci. 40, p. 367-369.
35. Stanley, .W. 1981. Non bitter protein hydrolyzates. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 14, p. 49-52.

36. Cogan, U., Moshe, M., Mokady, H. 1981. Debittering and nutritional upgrading of enzymatic casein hydrolyzates. *J. Sci. Food Agric.* 32, p. 459-466.
37. Arai, S., Maeda, A. 1986. Enlarged-scale production of a low-phenylalanine peptide substance as a foodstuff for patients with phenylketonuria. *Agric. Biol. Chem.* 50 (11), p. 2929- 2931.
38. Yamashita, M., Arai, S., Amano, Y., Fujimaki, M. 1976. A low phenylalanine, high tyrosine plastein as an acceptable dietetic food. Methods Of separation by use enzymatic protein hydrolysis and resynthesis. *J. Food Sci.* 41, p. 1029-1032.
39. Sen, D.P., Sripathy, N.V., Lahiry, N.L., Sreenivasan. A. Subrahmanyam, V. 1985. Fish hydrolysates. I rate of hydrolysis of fish flesh with papain, *Food Technol.* May 1982, 138-141.
40. Mohr, V. 1978. Fish protein concentrate production by enzymatic hydrolysis. En : *Biochemical aspects of new protein food*, p. 53-62 pergamon press, England.
41. FAO. 1970. Contenido en aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre las proteínas, Roma.

42. Kilara, A. 1985. Enzyme modified protein food ingredients. *Process Biochemistry*, Vol. 20, No. 5, p. 143-157.
43. Association of official analytical chemists (AOAC) 1975. Edit. official methods of analysis of the association of analytical chemistry, 12th Ed., Washington D.C. USA.
44. Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22, 79. p. 79-80.
45. Greenberg, N.A., Shipe, W.F. 1978. Comparison of the abilities of trichloroacetic, sulfosalicylic and tungstic acids to precipitate protein hydrolyzates and protein. *J. Food Sci.*, 44, p. 735-737.
46. Moore, S., Stein, W.H. 1948. *J. Biol. Chem.* 178, p. 357.
47. McCaman, M.W., & Robbins, E. 1962. Fluorometric methods for the determination of phenylalanine in serum. *J. Lab. Clin. Med.* 59, p. 885.
48. Hill, D., Burnworth, L., Skea, L., Pfeifer, R. 1982. Quantitative HPLC analysis of plasma amino acids as orthophthaldialdehyde/ethanethiol derivatives. *J. Liq. Chromatogr.*, 5:12, p. 2369-2393.

49. Rhys, A.T. 1989. Fluorescence detection in liquid chromatography, p. 49-56. Perkin-Elmer, England.
50. Appleman, M.D. 1973. High protein fruit. type beverage and processing therefore. Br. Patent 1,308,690 (to Davlin Laboratories, Inc., USA).
51. American dry milk Inst. 1971. Edit. standards for grades of dry milk, including methods of analysis, Bulletin 916. Chicago. USA.
52. Liconsa, libro de fórmulas, código 0600. Hoja de especificaciones : leche en polvo descremada (para mezclar en seco).
53. Tabla del Inst. Nal. de la Nutr. valor nutritivo de los alimentos mexicanos. 1983. México.
54. Lopez, A. 1987. Cinética enzimática básica. En : tecnología enzimática, p. 29-35. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
56. Narahashi, Y. 1972. J. Biochem. 71:1077.

57. Lopez, L.J. 1989. Desarrollo de un alimento bajo en fenilalanina. II. separación de fenilalanina de un hidrolizado de proteína. México, D.F. (tesis).