



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



62
2

" HIDROLISIS ENZIMATICA DE CASEINA PARA LA
MODIFICACION DE SUS PROPIEDADES
FUNCIONALES ".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA EUGENIA HERNANDEZ LOPEZ

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. AGUSTIN LOPEZ-MUNGUIA CANALES

VOCAL: M. en C. FRANCISCA ITURBE CHINAS

SECRETARIO: Dra. AMANDA GALVEZ MARISCAL

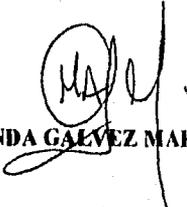
1er. SUPLENTE: M. en C. MARCOS F. BAEZ FERNANDEZ

2do. SUPLENTE: Dra. AMELIA MA. DE GPE. FARRES GONZALEZ-SARAVIA

Lugar donde se desarrolló la tesis:

**DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA, FACULTAD DE
QUIMICA. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.**

DIRECTOR DE TESIS:


Dra. AMANDA GALVEZ MARISCAL

SUSTENTANTE:


MARIA EUGENIA HERNANDEZ LOPEZ.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. Amanda Gálvez Mariscal por la oportunidad que me brindó durante el desarrollo de este proyecto, por su asesoría, confianza y amistad.

Al jurado de esta tesis, particularmente a la Dra. Amelia Farrés, por sus sugerencias y observaciones durante la revisión del manuscrito.

A la Biol. Idalia Flores y a la QFB Gabriela Isunza, por su asesoría y valiosos comentarios, así como su amistad.

A mis queridos amigos y compañeros del laboratorio 312 y del Depto de Alimentos y Biotecnología: Ma. Luisa A., Alicia M., Jesús V., Adelfo E., Ismael B., René de los R., Rodolfo C., Luis D., Laura M., José Luis R., Hilario A., Norma C., Angeles S., Magdalena A., Nora, Andrea, Marti, Cristina, y al Dr. Guillermo A. y Blanca T., Agustín R., Julieta S., Sandra P., Juanita P., Miriam U. Fabián O., Claudia S., Enrique M., Martha G., Tere F., Rocio S., y Lety G. por las muestras de simpatía y amistad, gran apoyo, conocimientos y consejos brindados.

A los profesores que con sus enseñanzas, apoyo y estímulos nos alientan para seguir en el conocimiento.

A Paty Vargas, Marcos Ordaz y Angélica Alcocer del Depto de Posgrado de la Fac. de Química, por las sugerencias y facilidades recibidas en la realización del manuscrito, así como su amistad.

A todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron en la realización del presente estudio.

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre

A mi madre

A mis hermanos: Alicia, Margarita, Héctor, J. Manuel, Rosa y Ricardo

A mis pequeños: Ursula, Ulises, Ana, Ximena y Emiliano

A mi tía Carmela

Por esos sentimientos encontrados con que siempre viviremos para seguir adelante.

A mis siempre amigas: Luz Ma. Lazo y Nelly Belmont, Sandra Franco, Celia Tapia, Lorena Amezcua y Clara Bracho.

A Rafael A., Erasmo A., Mario G., y Edgar K.

Por esos momentos gratos (y los no tan gratos) con que llenamos los huecos de nuestras vidas.

Amén.

CONTENIDO

	Pags.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVOS.....	4
GENERALIDADES.....	5
Desnutrición.....	5
Clasificación de desnutrición.....	6
Trastornos fisiológicos.....	7
Modificación de proteínas.....	12
Hidrólisis enzimática.....	14
Enzimas proteolíticas.....	18
Usos de enzimas proteolíticas.....	18
Caseína y caseinatos.....	19
Emulsiones.....	21
Agentes emulsificantes.....	25
Estabilizantes.....	26
MATERIALES Y METODOS.....	28
Determinación de actividad enzimática.....	28
Determinación de proteína soluble.....	30
Selección de enzimas.....	30
Hidrólisis enzimática de la caseína.....	31
Nivel de proteína soluble.....	32
Osmolaridad de los hidrolizados.....	33
Desarrollo de la fórmula.....	35
Preparación de las emulsiones.....	35
Evaluación de estabilidad de las emulsiones.....	36

RESULTADOS Y DISCUSION.....	39
Resultados de actividad enzimática.....	40
Criterios de selección.....	40
Desarrollo de la fórmula.....	48
Evaluación de la estabilidad de las emulsiones.....	52
Índice de actividad emulsificante.....	53
Resistencia a la coalescencia y estabilidad emulsificante.....	56
Resultados de glóbulos de grasa.....	59
CONCLUSIONES.....	60
REFERENCIAS.....	62
APENDICE.....	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Fórmula modificada de caseína.....	35
Tabla 2.- Enzimas proteolíticas consideradas para el proyecto.....	39
Tabla 3.- Resultados de actividad enzimática de las enzimas.....	40
Tabla 4.- Resultados cualitativos del sabor de los hidrolizados para caseinato de sodio.....	41
Tabla 5.- Resultados cualitativos del sabor de los hidrolizados para caseinato de calcio.....	42
Tabla 6.- Resultados cualitativos del sabor de los hidrolizados para caseína.....	43
Tabla 7.- Resultados de proteína soluble y osmolaridad del hidrolizado	47
Tabla 8.- Costos de enzimas: Proteasa N, Proteasa 2A y Alcalasa 0.6L.....	48
Tabla 9.- Niveles de fórmulas comerciales.....	49
Tabla 10.- Osmolaridad de la formulación.....	50
Tabla 11.- Resultados del índice de actividad emulsificante.....	54

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 - Diagrama de flujo del proyecto.....	34
Fig. 2.- Gráfica de proteína soluble.....	45
Fig. 3.- Gráfica de osmolaridad del hidrolizado.....	46
Fig. 4.- Gráfica de osmolaridad de la formulación.....	51
Fig. 5.- Gráfica del índice de actividad emulsificante.....	55
Fig. 6.- Representación esquemática de los tipos de emulsiones.....	58

RESUMEN

Algunas modificaciones enzimáticas de las proteínas han servido para perfeccionar nuestros conocimientos sobre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas de los alimentos. La mejora de estas propiedades funcionales se ha intentado por vía de la hidrólisis utilizando proteasas, las proteasas ejercen una influencia en la catálisis de las proteínas, al romper las uniones peptídicas de la cadena de aminoácidos, es por eso que los hidrolizados enzimáticos son evaluados en el uso de fórmulas alimentarias como posibles tratamientos para suprimir las alergias que se ocasionan por algunas proteínas, son utilizados en formulaciones infantiles por su facilidad de absorción y por su baja alergenicidad. En el presente trabajo se desarrolló una hidrólisis enzimática que consiste en tratar caseína con enzimas proteolíticas, a fin de disminuir su peso molecular, para obtener un hidrolizado compuesto de péptidos de fácil absorción, que servirá como base para adicionar grasas y carbohidratos con lo que se formará un complemento para alimentación, pero manteniendo sus propiedades funcionales para formar una emulsión estable de los componentes de la dieta y utilizando maltodextrinas en polvo con un valor promedio de 10 Dextrosa Equivalente (D.E.), para obtener una osmolaridad adecuada. Para comprobar la eficiencia de la hidrólisis a los hidrolizados se les determinó: **Proteína soluble**, por el método de Lowry, **osmolaridad**, medida en miliosmoles/L, **sabor**, evaluado sensorialmente, **estabilidad de la emulsión**, que mide consistencia y homogeneidad, tomando en cuenta: temperatura y pH óptimos de cada enzima, así como la concentración de sustrato para cada hidrólisis. De las propiedades funcionales particularmente la emulsificación es muy importante para la preparación estable del producto, una vez comprobada la eficiencia del hidrolizado enzimático para obtener una emulsión se procedió a optimizar el proceso de hidrólisis con las enzimas preseleccionadas: Alcalasa 0.6L, Proteasa N, y Proteasa 2A, a fin de obtener una formulación compuesta de carbohidratos (sacarosa y maltodextrinas) al 9 % y grasa (aceite de maíz y lecitina) al 4%, con una concentración de proteína del 3%, de acuerdo a las proporciones sugeridas en la práctica clínica. A estas formulaciones se les midió osmolaridad, resistencia a la coalescencia, e índice de actividad emulsificante (IAE), que son parámetros importantes que indican una buena capacidad emulsificante. Para seleccionar a la enzima más adecuada, además de tomar en cuenta los parámetros anteriores, se tomó en cuenta el costo y disponibilidad de la enzima. Basándonos en los resultados obtenidos las enzimas seleccionadas fueron: **Proteasa N** en 30 minutos con una osmolaridad de 404.1 mOsm/ y un IAE de 54.77, y **Proteasa 2A** con una osmolaridad de 439.0 y un IAE de 60.57, ambas con buena estabilidad emulsificante, en ninguno de los casos se observó separación de aceite.

INTRODUCCION

Son varios los desarrollos científicos y técnicos que han incidido en la enzimología alimentaria y que permiten prever una expansión importante en los próximos años. Alrededor de un 65 % de las enzimas que se producen industrialmente están de una u otra manera relacionadas con la industria alimentaria, aunque es conveniente señalar que solamente las proteasas alcalinas empleadas en detergentes ocupan 25% del total de esta distribución, el 10 % restante corresponde a aplicaciones en las áreas farmacéutica y analítica, (García G., Quintero, R., López-Munguía, 1993).

El tamaño del mercado actual de las enzimas es difícil de estimar, primeramente por razones de índole puramente comercial y también por el hecho de que en varios procesos las enzimas son producidas y consumidas por las mismas empresas. Es el caso de los procesos enzimáticos de producción de aminoácidos y de algunas compañías productoras de jarabes glucosados y fructosados. La mayoría de las enzimas empleadas comúnmente en la industria son de origen microbiano. El mercado de enzimas microbianas en México se estima en 17 millones de dólares anuales (ibid).

Para ser útiles y por tanto utilizables comercialmente, las enzimas deben hacer que un producto elaborado con su ayuda tenga alguna de las ventajas siguientes: i) que su calidad sea superior a la del producto tradicional, ii) que sea más útil en sus aplicaciones, iii) que sea más barato, lo que puede conseguirse indirectamente, por ejemplo, disminuyendo los costos de operación y/o equipos requeridos en la manufactura del proceso, y iv) la última y más importante, que mediante las enzimas se puedan obtener productos que no existían previamente o sólo en cantidades limitadas, debido a su reducida disponibilidad a partir de fuentes naturales.

Existe un amplio rango de aplicaciones en los que el tratamiento enzimático es muy útil para mejorar la calidad o la facilidad de producción de un compuesto, u obtener un producto intermedio en un

proceso de difícil síntesis química, a menudo en operaciones que han sido llevadas a cabo tradicionalmente sin el empleo de tales enzimas. Por ejemplo, la adición de lipasas acelera la maduración de los quesos, las pectinasas y amilasas se emplean para reducir la viscosidad de los jugos de frutas así como para facilitar la posterior clarificación del jugo por filtración o floculación, la utilización de dextranasas para hidrólisis de los polisacáridos durante la producción de azúcar y muchos otros ejemplos que implican el uso de enzimas (A. Wiseman, 1991).

Una de las alternativas en el uso de enzimas, en el caso de proteasas, es el desarrollo de hidrolizados enzimáticos que permiten un mejor aprovechamiento de los nutrimentos alimenticios, al modificar las propiedades funcionales de las proteínas. Una hidrólisis enzimática controlada de proteínas bien equilibradas en aminoácidos, permite obtener una fuente de péptidos mejor utilizada por el organismo, que las mezclas de aminoácidos que normalmente se utilizan para la alimentación de pacientes hospitalizados, a menor costo. Los hidrolizados son de gran interés sobre todo en casos de deficiencia digestiva, porque al modificar a las proteínas disminuyen su peso molecular, lo que las hace de fácil absorción (Mohr, 1978).

En el presente proyecto se propuso elaborar una formulación que consistió en realizar una hidrólisis enzimática de caseína con el propósito de mejorar sus propiedades funcionales que permitieran formar una emulsión estable y de osmolaridad apropiada con todos sus componentes de la dieta, tomando en cuenta: concentración de enzima, concentración de proteína.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar una hidrólisis controlada de caseína con enzimas proteolíticas disponibles en el mercado nacional, para obtener una fórmula alimenticia de fácil absorción que consista en una emulsión estable, contenga carbohidratos, lípidos y proteínas en las proporciones adecuadas para una buena nutrición.

OBJETIVOS PARTICULARES

Seleccionar las enzimas proteolíticas en función del sabor del hidrolizado, la osmolaridad obtenida, el porcentaje de proteína soluble, y la facilidad que tenga el hidrolizado para formar una emulsión.

Elegir las condiciones de hidrólisis más convenientes con respecto a: Tiempo de hidrólisis y dosis enzimática a utilizar en el proceso.

GENERALIDADES

DESNUTRICION

En el mundo existe un importante segmento de la población, que ha sufrido largos periodos de mala nutrición y repetidos ataques de enfermedades infecciosas y parasitarias, que en gran medida obedecen a la combinación de pobreza económica, desánimo, viviendas insalubres y desconocimiento de las nociones básicas de higiene o falta de voluntad para observarlas. Su posibilidad de sobrevivencia entonces depende de la capacidad de adaptación del ser humano, que de modo transitorio o permanente implica el sacrificio de algunas funciones vitales, el agotamiento de reservas orgánicas de nutrimentos o el desgaste de ciertos tejidos del cuerpo.

Los efectos de la desnutrición en la salud son muy evidentes en los lugares del mundo en donde la disponibilidad de alimentos es escasa, en especial los alimentos que proporcionan proteínas de alta calidad y micronutrientes más fácilmente disponibles que por lo general son los de más alto costo. Por lo que la salud de un individuo depende de la suficiencia de nutrientes para satisfacer las necesidades corporales para el crecimiento, el desarrollo y el mantenimiento (Frenk, 1989).

En países en desarrollo, donde una gran proporción de la población subsiste en condiciones precarias, los principales problemas nutricionales son debidos a dietas insuficientes para satisfacer las necesidades alimentarias, y las enfermedades que se presentan con más frecuencia son debidas a deficiencia calórico-proteica; este tipo de deficiencia es muy simple y se reduce únicamente a que el organismo al nivel de los tejidos, no está recibiendo el aporte mínimo necesario de fuentes de energía (calorías) o de los constituyentes esenciales para su formación, mantenimiento y reposición (proteínas). Este aporte insuficiente puede ser debido a que la dieta no provee las cantidades requeridas, es decir, deficiencia primaria o de origen dietético, o a que existen factores que:

- 1.- Impidan la adecuada utilización de los alimentos ingeridos (procesos diarreicos crónicos, síndrome de malabsorción).
- 2.- Establezcan demandas exageradas a causa de enfermedades como tuberculosis o las neoplasias gástricas.
- 3.- Que promuevan pérdidas exageradas por hipertiroidismo a causa del mal funcionamiento de la glándula tiroides, para el caso de las calorías; o enteritis exudativa que se presenta por la inflamación de la mucosa intestinal, para el caso de las proteínas.

Aunque el problema es mucho más prevaeciente y serio en niños pequeños por su crecimiento, los efectos de la desnutrición calórico-proteica también se pueden observar, con similares características en individuos adultos. Estas deficiencias traen como consecuencia las siguientes características (Frenk, 1989):

- 1.- Disminución de actividad física.
- 2.- Transtomos en el sistema inmunológico.
- 3.- Velocidad de crecimiento lenta.
- 4.- Morbilidad.
- 5.- Mortalidad.

La desnutrición puede provocar diarrea y la diarrea de origen infeccioso, puede también a su vez, conducir a la desnutrición. La forma más indicada de romper el círculo diarrea-desnutrición una vez que se presenta, es mediante la rehidratación corporal seguida de una terapia nutricional apropiada para el paciente (Sepúlveda, 1988).

CLASIFICACION

La desnutrición es la asimilación deficiente de nutrimentos, que conduce a un estado patológico de distintos grados de severidad y manifestaciones clínicas. Gómez en 1946, clasificó a la desnutrición en tres grados, basándose en el peso corporal:

Desnutrición de primer grado: cuando se presentan pérdidas de peso no mayores del 25 % del peso normal

Desnutrición de segundo grado: cuando la pérdida de peso fluctúa entre 25 y 40 % del peso normal.

Desnutrición de tercer grado: cuando la pérdida de peso rebasa el 40 % del peso normal.

Esta clasificación es aceptada mundialmente, para diagnosticar el estado nutricional de los pacientes. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta otros factores como el crecimiento físico, la composición corporal y el desarrollo físico. Algunos autores han realizado propuestas interesantes en base a esto para lograr una más fácil comparación somatométrica entre diferentes grupos de pacientes (Ramos, 1977). La desnutrición afecta principalmente a niños menores de 5 años, a las mujeres embarazadas, a los ancianos y enfermos.

TRASTORNOS FISIOLÓGICOS

Se ha visto en algunos estudios que el nivel de amilasa salival disminuye en la desnutrición. El jugo gástrico también se ve reducido, lo que implica una menor protección contra microorganismos patógenos. El páncreas se vuelve fibroso y presenta vacuolas en el citoplasma de las células acinares, alterando su funcionalidad como secretor de enzimas indispensables para el desarrollo de los alimentos (Romer, 1983).

La motilidad del intestino se ve afectada por cambios en el nivel de serotonina y adrenalina. En el niño con marasmo (el marasmo se expresa como una enfermedad crónica por desnutrición y generalmente se presenta durante el primer año de vida), disminuye la altura de las vellosidades de la mucosa intestinal, reduciendo así, la superficie de absorción. En el kwashiorkor (es otra forma de desnutrición que se presenta en niños de 1 a 4 años de edad, que recibieron dietas deficientes, mal

balanceadas), el grosor de la mucosa no se afecta y además puede acumularse grasa en las células epiteliales. El intestino contiene en la membrana de borde del cepillo, enzimas disacaridasas que hidrolizan carbohidratos obteniendo como productos: glucosa, galactosa y fructosa. Entre las disacaridasas, la más afectada al existir un cuadro de desnutrición es la lactasa, por encontrarse en la parte más superficial del borde de cepillo del intestino, su concentración es menor que las otras enzimas y se ve limitada aún en la desnutrición de primer grado, al ser deficiente la lactasa, la lactosa no es hidrolizada y ejerce una presión osmótica elevada dentro del intestino produciendo diarrea. Por otro lado si existe una infección bacteriana, la lactosa es fermentada por los microorganismos a ácido láctico causando irritación de la mucosa y problemas de flatulencia, dolor abdominal, distensión, etc. A este cuadro se puede sumar el que existan problemas de absorción de glucosa y galactosa ya que su transporte a través de la mucosa requiere de un gasto energético (ATP) que se encuentra disminuido durante la desnutrición.

Los aminoácidos o péptidos que se forman a partir de la hidrólisis enzimática de las proteínas, necesitan una concentración elevada de sodio en las células epiteliales de la mucosa intestinal para ser absorbidos y transportados hasta el torrente sanguíneo.

Las enzimas que intervienen en la hidrólisis de las proteínas son: la pepsina, que es secretada en el estómago; los precursores de la tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa, que son secretadas en el páncreas así como las aminopeptidasas de la mucosa intestinal (Ganong, 1994).

Los lípidos, durante el proceso digestivo, son hidrolizados por la lipasa pancreática para formar ácidos grasos y monoglicéridos, que se absorben a través de la mucosa por diversos mecanismos según su peso molecular. Para que la lipasa pancreática actúe sobre los lípidos, éstos deben ser emulsificados por sales biliares provenientes del hígado. En condiciones normales las sales biliares se desconjugan en el colon e ileon terminal, pero en el caso de infecciones, la población bacteriana presente en el duodeno y el yeyuno desconjuga a los ácidos biliares en la parte superior del intestino

evitando la formación de las micelas y disminuyendo así la absorción de las grasas; los ácidos biliares desconjugados dañan a su vez las microvellosidades de la mucosa.

Se ha visto también que la secreción de lipasa disminuye en la desnutrición por daño al páncreas, y se presenta también estatorrea (presencia de un exceso de grasa en las heces), consecuencia de la malabsorción de lípidos. La absorción defectuosa de grasas trae como última consecuencia que la vitaminas liposolubles no se absorban en cantidades suficientes (Ganong, 1994).

El aprovechamiento de otros nutrimentos como vitaminas hidrosolubles y minerales también se ven directamente afectados por la malabsorción de carbohidratos, proteínas y grasas ya que sus mecanismos de transporte y absorción son dependientes de dichos procesos de digestión (Kleinman, 1989).

Las infecciones bacterianas que acompañan muchas veces a la desnutrición, provocan un aumento en el catabolismo. Se ha calculado que por cada grado de fiebre, existe un aumento del 5 al 8 por ciento del metabolismo basal (Sepúlveda, 1988).

Otro factor que se presenta en la desnutrición es la deshidratación, y es la causa de mortalidad más importante en niños que presentan diarrea, y por lo tanto lo primero que hay que mantener es el balance de agua, de electrolitos y el equilibrio ácido-base. Es por esto que la Organización Mundial de la Salud recomienda el uso de una solución de glucosa y electrolitos conocido como suero oral (Pizarro, 1988). Una vez recuperado ese equilibrio, lo importante es recuperar la capacidad de absorción intestinal. Diversos grupos de investigación en el mundo, han desarrollado fórmulas y dietas, a fin de lograr una pronta recuperación en los pacientes con mala nutrición.

Las fórmulas son de lo más diversas y su composición y elaboración se ha basado en la disponibilidad de alimentos en la población, su costo, la edad y el cuadro patológico que se presenta en el paciente. Entre las fórmulas que más se emplean encontramos dietas elementales, hidrolizados proteínicos, fórmulas de soya y dietas a base de carne (Kenpe, 1983).

Cuando por una u otra razón disminuye la ingestión de alimento, el crecimiento y el peso se pueden mantener por algún tiempo al reducirse el gasto de energía, en parte a expensas de la actividad física, ocasionando distorsiones en el metabolismo. Este patrón de ajuste primario del balance de energía puede prolongarse hasta la vida adulta, debido a la mala nutrición durante la niñez (Frenk, 1989).

Los pacientes con problemas digestivos o de absorción, entre ellos los que sufren disfunción pancreático-biliar o síndrome de intestino corto, necesitan fuentes de nutrimentos predigeridos o elementales. Los hidrolizados de proteínas que contienen aminoácidos adicionales o una solución sintética de aminoácidos cristalinos pueden ayudar en este tipo de problema.

Entre las variantes clínicamente más importantes en las fórmulas están su contenido de lactosa, su osmolaridad y la forma molecular de sus sustratos. El borde de cepillo intestinal de muchos adultos, en especial de los de raza negra, chinos y los de procedencia mediterránea no presenta niveles altos de lactasa, lo cual produce intolerancia a los regímenes que proporcionan lactosa. La osmolaridad de la solución es un aspecto muy importante tratándose de enfermos que están siendo alimentados en sitios distales del píloro. Se ha insistido en que las soluciones hiperosmolares aplicadas directamente en el intestino delgado pueden ocasionar alteraciones rápidas de líquidos y electrolitos, ocasionando con ello diarreas agudas y efectos sistémicos semejantes al síndrome de vaciamiento rápido.

Por último, la composición molecular de los sustratos en las dietas a base de fórmulas varían de manera considerable. Una dieta que se administra por vía intragástrica y que se base en proteínas, almidones y aminoácidos de cadena larga intactos casi siempre, se tolera bien si las funciones proteolíticas y lipolíticas están intactas. Estas formas de alto peso molecular presentan generalmente una baja osmolaridad y son de costos moderados, además de que su rendimiento en la formulación es generalmente de 1 Kcal/ml.

Las fórmulas compuestas de aislados de proteínas obtenidas de caseína, soya, así como los oligosacáridos y los ácidos grasos de cadena larga, no contienen lactosa en absoluto. Estas dietas son muy poco hiperosmolares, se toleran bien y también rinden 1 Kcal/ml. Son fórmulas que requieren una función proteolítica o lipolítica normal, pues de lo contrario no se aprovechan debidamente.

Entre las fórmulas nutricionalmente completas en solución para ser administradas por sondas o por vía oral y que contienen nutrientes intactos, están las destinadas a suministrar suficientes nutrientes para el mantenimiento y rinden un 30 % de sus calorías a partir de la grasa y entre 12 y 16 % a partir de las proteínas. Los productos varían muchísimo en su contenido de lactosa, osmolaridad y sabor. La osmolaridad oscila a veces entre 300 y 400 mOsm. Estas fórmulas requieren una capacidad intacta de los procesos de digestión y absorción, puesto que los nutrientes son proteínas enteras, carbohidratos complejos y grasas de triglicéridos.

Fórmulas nutricionalmente completas en soluciones para ser administradas por sonda o por vía oral, que contienen proteínas hidrolizadas o aminoácidos. Las fórmulas que contienen proteínas hidrolizadas o aminoácidos reciben a veces el nombre de dietas elementales. Entre sus ingredientes cabe mencionar: aminoácidos, proteínas hidrolizadas, polisacáridos, ácidos grasos esenciales, vitaminas y minerales. Estos nutrientes requieren una digestión mínima y se absorben sin dificultad. Si los productos son de sabor desagradable, la mejor manera de administrarlos es por sonda.

Cuando con los alimentos y bebidas ordinarios no se satisfacen las necesidades de nutrientes del individuo, se hace necesario un suplemento nutricional para elevar el aporte de esas sustancias. En el caso de algunos pacientes que no están en condiciones de observar una dieta normal a causa de alguna enfermedad, esta ha de ser modificada para que se pueda administrar mediante una sonda de pequeño calibre. Otros pacientes afectados de enfermedades gastrointestinales graves, no logran absorber bien los alimentos ingeridos y, por lo mismo, necesitan alimentación parcial o total por la vía parenteral (Taylor and Luean, 1991).

Las observaciones de Hegarty, (1982), indican que la absorción de hidrolizados proteínicos constituidos por péptidos pequeños es mayor a su equivalente (en términos de nitrógeno) de mezclas de aminoácidos libres (a molaridades elevadas). En base a estos resultados se ha propuesto que las dietas enterales químicamente definidas incluyan péptidos de cadena corta en vez de aminoácidos libres.

MODIFICACION DE PROTEINAS

Las proteínas y específicamente de origen animal, presentan diversas propiedades fisicoquímicas como son: solubilidad, plasticidad, carácter ligante y emulsificante, que es necesario dominar para poder controlar las propiedades de los sistemas alimentarios durante la transformación y por último, las propiedades mecánicas de productos obtenidos con ellas.

El objetivo buscado en los hidrolizados al modificar las propiedades funcionales de las proteínas es, en general obtener productos solubles, pero al aumentar la solubilidad se perderán otras propiedades funcionales. Sin embargo una hidrólisis bien controlada permitiría que al disminuir el peso molecular y ser más soluble, la proteína mejore sus propiedades emulsificantes. Por otro lado cabe la posibilidad de que los fragmentos formados se desdoblén más fácilmente que la proteína intacta debido a la disminución de las fuerzas intermoleculares aumentando de esta forma su capacidad emulsificante (Smith, 1985).

Esta modificación puede ser realizada de diferentes maneras:

- * **Por hidrólisis ácida**
- * **Por hidrólisis básica**
- * **Por hidrólisis enzimática**

La modificación de proteínas por hidrólisis puede presentar ciertas desventajas, ya que pueden formarse péptidos amargos por lo que es difícil fabricar productos de un sabor neutro. El sabor amargo de muchos hidrolizados provocó que las primeras investigaciones se realizaran en torno a este problema. Ahora se sabe que el sabor amargo se relaciona con el grado de hidrólisis y con el carácter hidrofóbico de los péptidos, actualmente es posible eliminar el sabor amargo de los hidrolizados proteicos mediante una separación selectiva, por reacción de plasteina, por enmascaramiento o por aplicación de exopeptidasas (Adler, 1986).

Si el proceso se realiza en condiciones ácidas, hay menor especificidad por parte del ácido o el álcali usados para hidrolizar, obteniéndose además productos secundarios indeseables que disminuyen el rendimiento y pureza del producto principal. Por ejemplo, la hidrólisis de proteínas y carbohidratos puede catalizarse con ácidos fuertes como el sulfúrico o clorhídrico, pero la menor eficacia de los catalizadores químicos obliga a realizar los procesos a elevadas temperaturas y presiones, con el consiguiente gasto energético y corrosión de las instalaciones (Serrano, 1985).

Si el proceso se efectúa por hidrólisis alcalina se puede producir una disminución en la calidad nutricional por destrucción de ciertos aminoácidos y por racemización, en este caso se debe prever la alimentación de sal del producto después de neutralizar el hidrolizado (Adler, 1986).

Cuando la proteína está desnaturizada los enlaces peptídicos se encuentran más accesibles por lo que la cinética de la hidrólisis es diferente a la proteína en su estado original. Si la proteína sufre una desnaturación irreversible, esta tiende a agregarse y se vuelve insoluble alterando la velocidad de hidrólisis por fenómenos de adsorción y difusión (Adler, 1986).

HIDROLISIS ENZIMÁTICA

Las propiedades funcionales de las proteínas pueden ser favorecidas mediante una hidrólisis enzimática controlada, ya que modifica el tamaño molecular de las proteínas, alterando su conformación y produciendo cambios en las fuerzas intra e intermoleculares de los enlaces peptídicos (Phillips, 1981).

Para lograr una adecuada modificación de las proteínas por hidrólisis enzimática se deben tomar en cuenta diversos parámetros, como la selección de la proteasa o proteasas a utilizar, que depende de factores como el costo, la actividad, la estabilidad, la especificidad y las condiciones de temperatura y pH en los cuales se presenta la mejor actividad (Burgeois 1986)

La ruptura o hidrólisis de los enlaces peptídicos trae como consecuencia las siguientes modificaciones:

- 1) Incremento del número de grupos polares.
- 2) Aumento en la hidrofiliidad del producto.
- 3) Disminución del peso molecular de las cadenas peptídicas.
- 4) Posible alteración en la conformación molecular, esto es que al haber ruptura de enlaces peptídicos se presenta una separación de los dominios de la proteína o bien se abre la compacta estructura globular, exponiendo una mayor cantidad de grupos hidrofóbicos del medio acuoso (Phillips and Beuchat, 1980).

La hidrólisis enzimática es la más eficiente, en los siguientes términos:

- a) Las enzimas además de ser de origen natural, no son tóxicas
- b) Son muy específicas en su forma de acción, ya que efectúan reacciones que de otra manera serían difíciles.
- c) Funcionan en condiciones moderadas de temperatura y pH, por lo que no se requieren condiciones drásticas que puedan alterar la naturaleza del alimento, ni equipo muy costoso.

d) Actúan a bajas concentraciones y su velocidad de reacción puede ser controlada al ajustar el pH, la temperatura y la concentración de la enzima, por lo que el hidrolizado puede ser realizado en condiciones suaves, y

e) Son fácilmente inactivadas después de haber terminado el proceso deseado.

La mayor parte de las reacciones enzimáticas pueden ser descritas por el modelo de Michaelis-Menten o bien por los modelos desarrollados para desviaciones tales como reversibilidad de la reacción, inhibición por exceso de sustrato y/o inhibición por alguna sustancia que con frecuencia es producto de la misma reacción.

Finalmente destacan la eficiencia catalítica y la especificidad de las enzimas, que varía de acuerdo a la enzima y al sustrato que se utilizará, dado que las enzimas pueden actuar como reguladores y también pueden ser reguladas. En la mayoría de los casos el sustrato se encontrará en exceso, de modo que el factor limitante de la velocidad sea la enzima.

En una reacción enzimática hay tres fases (Wiseman, 1991): En la primera, la concentración de enzima libre disminuye drásticamente, puesto que la mayor parte se combina con el sustrato en un equilibrio dinámico, que persiste mientras haya moléculas de sustrato libres. La velocidad de reacción depende de la energía con la que se une al sustrato. En la segunda fase, todos los reactantes incluyendo las moléculas de enzima, están en equilibrio dinámico y se alcanza la actividad máxima, puesto que la alta concentración de sustrato permite que las moléculas de enzima vuelvan a formar los complejos enzima-sustrato muy rápidamente, inmediatamente después de haber transformado las moléculas de sustrato previa. En la tercera fase de la reacción la concentración de sustrato disminuye apreciablemente, con lo que la velocidad de la reacción catalizada por la enzima decae asintóticamente. Esta fase es especialmente importante en muchas reacciones enzimáticas, donde se

desea que la reacción transcurra completamente y tanto el rendimiento como la concentración del producto obtenido sean máximos, de tal forma que las interacciones entre factores tales como las concentraciones de enzima y sustrato y las condiciones de reacción son de crucial importancia, por lo que en cualquier experimento de hidrólisis enzimática se debe controlar:

- **La concentración de sustrato**
- **La relación enzima/sustrato**
- **El pH**
- **La temperatura**

Estos cuatro parámetros tienen influencia sobre la velocidad de reacción que se cataliza y son los que determinan el proceso de reacción que es la hidrólisis (Adler, 1986).

El efecto de pH en la actividad de la enzima depende de la concentración de iones hidrógeno del medio, esta dependencia puede deberse a cambios en los grados de ionización de los aminoácidos del sitio activo de la enzima, del sustrato, o bien del complejo enzima-sustrato, lo que afecta la afinidad que tiene la enzima por el sustrato. En algunos casos los sustratos no son ionizables, como por ejemplo los carbohidratos, por lo que los grupos iónicos de las enzimas son los únicos afectados por el pH. En ocasiones es necesario seleccionar la proteasa en función del pH del alimento en el cual se hidroliza la proteína. Es necesario insistir en que el pH al cual la enzima alcanza su máxima actividad no coincide necesariamente con el pH al que observa su máxima estabilidad.

El efecto de la temperatura en las reacciones catalizadas por enzimas, al igual que otras reacciones químicas se traduce en que la velocidad de reacción enzimática aumenta con la temperatura, dentro del intervalo en el que la enzima es estable y retiene su capacidad catalítica. A medida que aumenta la temperatura aumenta también la velocidad de reacción y en el punto en que se rebasa una cierta

temperatura se llega a la inactivación de las enzimas por un proceso de desnaturalización al que son sensibles la mayor parte de ellas, y que puede tener una naturaleza reversible. Cada enzima presenta su óptimo de temperatura en el que las reacciones se efectúan a una velocidad máxima.

El tiempo de reacción también es un factor importante y va relacionado con la temperatura y pH, que deben ser los óptimos de actividad enzimática (actividad máxima de la enzima); y del tiempo de reacción va a depender el grado de hidrólisis que se lleve a cabo es decir, que va a ser proporcional al porcentaje de proteína soluble y por lo tanto la formación de péptidos, pero cuanto más tiempo pasa hay más probabilidad de presencia de péptidos que proporcionan un sabor amargo en el producto final (Adler, 1986).

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:

- 1.-La solubilidad de la proteína en donde la disponibilidad de agua (la reacción es de hidrólisis y por lo tanto uno de los reactivos es agua) es un factor para llevar a cabo la reacción.

- 2.-Los eventuales problemas de inhibición por exceso de sustrato, ya que la enzima llega a un estado de saturación de este. Cada enzima se caracteriza por presentar su actividad óptima a ciertas condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica. Es importante tomar en cuenta la relación enzima sustrato en la velocidad inicial de la hidrólisis más que la concentración misma de la enzima, porque el proceso de hidrólisis proteínica es ideal que se lleve a cabo en condiciones de saturación de la enzima; también es importante tomar en cuenta la naturaleza del sustrato (Adler, 1986).

ENZIMAS PROTEOLITICAS

Son enzimas que hidrolizan las proteínas en forma ordenada ya que la mayoría tienen cierta especificidad para un determinado enlace peptídico. Existen dos tipos de proteasas básicamente: las endopeptidasas, que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de las proteínas, y las exopeptidasas que atacan sus aminoácidos terminales. Este último grupo puede a su vez subdividirse en aminopeptidasas, que actúan por el lado del grupo amino terminal, y en carboxipeptidasas que hidrolizan los aminoácidos por el lado del carboxilo terminal (Adler, 1986).

Existen fuentes muy abundantes de proteasas de origen vegetal y animal, en los últimos años se han empleado muchos microorganismos para su obtención, entre los cuales los más importantes son: *B. subtilis*, *B. thermoproteoliticus*, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. sativae*, *Rhizopus sp.*, *S. griseus* y *Mucor pusillus*.

Las enzimas proteolíticas, se clasifican de acuerdo a su origen (animal, vegetal o microbiano), por su actividad catalítica (endopeptidasas y exopeptidasas), y por la naturaleza de su sitio activo, el cual le da características de especificidad, ver ejemplos adelante (Whitaker, 1977).

USOS DE ENZIMAS PROTEOLITICAS

El uso de las proteasas requiere de condiciones muy específicas de temperatura, pH, y fuerza iónica para mantener la hidrólisis en condiciones óptimas (Badui, 1989).

Sus usos son diversos:

Las proteasas son ampliamente usadas en la industria alimentaria en una gran diversidad de productos, lo mismo que las preparaciones comerciales de proteasas que son mezclas de varios tipos de enzimas, por lo que su acción proteolítica es muy diversa.

Entre las enzimas proteolíticas más importantes tenemos: la pepsina, tripsina, quimotripsina y renina (de origen animal). La renina es tal vez la enzima más antigua que se conoce ya que se ha empleado en la coagulación de la leche y en la manufactura de quesos. La papaina, bromelina y ficina son de origen vegetal, tienen en el sitio activo un radical sulfhidrilo por lo que son rápidamente inactivadas por reactivos o condiciones que modifiquen este grupo funcional; se usan para ablandamiento de carne, pues actúan sobre los tejidos conectivos, principalmente colágeno y elastina. La papaina se utiliza en homogenizados que se inyectan a los animales vivos y antes del sacrificio. Otros usos de estas proteasas se encuentran en la industria cervecera, para evitar el enturbiamiento a bajas temperaturas, ya que la turbidez de la cerveza se debe a la formación de un complejo proteína-tanino, y carbohidratos, propios de las materias primas con las que se elabora este producto. La acción de la papaina, bromelina y otras enzimas permite eliminar esa turbidez al hidrolizar la proteína, aunque estas enzimas no se usan tanto como las microbianas (Wiseman, 1991).

Las proteasas microbianas presentan más ventajas ya que los microorganismos pueden crecer rápidamente en diferentes condiciones, se pueden emplear para aplicar en la fabricación de aditivos para panificación y galletería, y ablandamiento de la carne.

CASEINA Y CASEINATOS

Las caseínas como los caseinatos son aprovechados por sus cualidades nutricionales; se emplean como fuente de proteínas. La caseína en sus diferentes formas, es la base esencial de suministro proteínico en la alimentación infantil y constituye un complemento importante en el equilibrio proteínico de la alimentación de los adultos. Graham y col. tuvieron éxito con el uso de Portagen (Mead-Johnson) en niños con Kwashiorkor y de Pregestimil (Mead-Johnson) en niños con marasmo, diarrea e infección grave asociados (Fomon, 1976).

Se utilizan también para estabilizar ciertas propiedades físicas de los productos cáncicos, productos de panadería y pastelería, dulces, helados, productos derivados de los cereales, sustitutos de crema batida, cremas para café (en forma de polvos) y productos dietéticos. Se les encuentra en la fabricación de sustitutos de la leche (leche con lactosa), desayunos instantáneos, en la producción de algunos quesos bajos en grasa, para darles una textura cremosa (Bourgeois and Le Roux, 1986).

Otros campos de aplicación son en la industria farmacéutica, en la Industria papelera en el tratamiento de la superficie del papel, para papeles de libros y periódicos apropiados para la impresión, industria de adhesivos (caseinatos alcalinos con componente cálcico como ligante, la industria textil para la fijación de colorantes, tratamientos impermeabilizantes y en la industria de colorantes (Charley, 1987).

CASEINAS:

La caseína es la principal proteína de la leche: un litro de leche contiene aproximadamente de 25 a 27 gramos de caseína; y en sus diferentes formas, es la base esencial de suministro proteínico en la alimentación infantil ya que constituye un complemento importante en el equilibrio proteínico de la alimentación de los adultos. Además de sus cualidades nutricionales, la caseína se conoce desde finales del siglo XIX por sus cualidades tecnológicas y a principios de siglo fué empleada para elaborar nuevos productos. Forma micelas estables a pH de 6.7 por efecto de su carga negativa que le confieren los ácidos glutámico y aspártico, además de que contiene residuos de fosfato de calcio esterificados a la proteína a través de los grupos OH de la serina y la treonina (P.Segalen, 1982).

CASEINATOS:

La clasificación de caseinatos está basado en el tipo de sal. Estos caseinatos son los siguientes:

- * Caseinato de sodio.
- * Caseinato de calcio.
- * Caseinato de potasio.
- * Caseinato de magnesio.

- * Caseinato de amonio.
- * Caseinato de aluminio.
- * Caseinato mixto (utiliza diferentes álcalis o sales).

Es el producto más abundante en proteínas que existe. Algunos caseinatos pueden ser producidos con 94 a 95 % de proteína en base húmeda o 97 a 98 % en base seca. Los aminoácidos se encuentran relativamente bien equilibrados aunque con una ligera deficiencia en aminoácidos azufrados (P. Segalen, 1982).

EMULSIONES

Una emulsión (Fennema, 1985; Charalambous, 1989; ACS, 1981), es un sistema heterogéneo constituido por dos líquidos inmiscibles (o mutuamente antagónicos). Uno de los líquidos forma la fase continua o dispersante, y el otro la fase dispersa y se encuentra en forma de pequeñas gotas cuyo diámetro varía entre 0.1 y 5 micras.

Una emulsión tiene tres fases: la primera denominada dispersa, consiste de gotitas suspendidas. En los alimentos generalmente éstas son de aceite, aunque no siempre. La segunda fase es la continua (también conocida como el "medio de las dispersiones"). En los alimentos, ésta es generalmente el agua. La tercera fase es para mantener las gotitas de un líquido suspendidas en otro, sin que se mezclen, por lo que se requiere de una tercera sustancia, cuyas moléculas tengan cierta afinidad por ambos líquidos. La afinidad debe ser parcial y desigual. Dicha sustancia se denomina emulsificante, cada emulgente u agente tensoactivo puede dispersar sólo una cantidad limitada de líquido en la fase interna o dispersa; es decir, tiene una determinada capacidad. Si este límite se sobrepasa, se rompe la emulsión por dilución conjunta con la fase externa o continua (Charley, 1981).

Lo que corresponde a una emulsión de aceite en agua (o/v), es cuando la fase dispersante o continua es el agua y la dispersa o discontinua es el aceite, como por ejemplo la leche, donde la fase dispersa

son los glóbulos de grasa y la fase continua es agua. Puede ocurrir al contrario, las emulsiones de agua dispersa en aceite (w/o), como por ejemplo: mantequilla.

También existen las llamadas emulsiones cármicas, que corresponden a un sistema más complejo en donde la fase dispersa es la grasa y la fase continua es una matriz acuosa compuesta por sales, proteínas, fibras musculares y tejido conectivo.

Generalmente las propiedades físicas que presenta una emulsión, son las mismas de la fase continua, por ejemplo, una emulsión o/w conduce la electricidad. La formación de una emulsión requiere de un gasto energético y constituye parte del trabajo requerido para formar la interfase alrededor de cada partícula. La distribución de tamaño de partícula de una emulsión está afectado por el tipo de homogenizador empleado. La forma de presentarse depende del diámetro de sus gotas, si el diámetro es mayor o igual a 1 micrón, se presenta como una emulsión lechosa. Si el diámetro está próximo a la longitud de onda luminosa (10^{-5} - 10^{-6} cm) el sistema es traslúcido y se designa como microemulsión. (Charalambous, 1989).

La estabilidad de una emulsión es la característica más importante de una emulsión, ya que de esta depende la apariencia y aceptación de la misma; la base para lograr la estabilidad de una emulsión está en el balance que existe entre las fuerzas de atracción de Van der Waals y las de repulsión electrostática (Teoría DLVD). Las fuerzas de atracción tienden a desestabilizar la emulsión mientras que las de repulsión la estabilizan ya que impiden la coalescencia o agregación de las partículas componentes de la fase dispersa. Si las fuerzas de repulsión son mayores a las de atracción, la emulsión tiende a ser estable.

El líquido con menor tensión superficial, se esparce más fácilmente y forma la fase continua. Al mismo tiempo, las moléculas del emulsificante se deben acumular en la interfase aceite/agua, para evitar la coalescencia de la fase dispersa. Una parte de la molécula debe tener una combinación de

átomos de manera que tenga afinidad con el aceite, es la parte no polar. La otra parte de la molécula debe ser de naturaleza polar, y tener capacidad para unirse fácilmente al agua

Las moléculas de un emulsificante se agrupan estrechamente alrededor de la gota de aceite, lo suficiente para formar una capa con el grosor de una molécula, la parte soluble en grasa de cada molécula del emulsificante se orienta hacia la molécula de grasa de la gota (cadena de hidrocarburo). La capa protectora alrededor de las gotas de aceite emulsificado consisten de tres capas: el glóbulo de aceite, la capa del emulsificante, y la molécula de agua (fase acuosa). Esta capa protectora de emulsificante evita que las gotas de aceite ya emulsificadas, se unan con las del aceite que se va agregando. Si dos gotas de aceite ya emulsificadas, se ponen en contacto, la capa protectora (emulsificante) evita su coalescencia (Charley, 1981). la parte soluble en grasa de cada molécula del emulsificante se orienta y se disuelve en la capa externa de las moléculas de grasa de la gota.

Así entonces los factores que intervienen en la estabilidad de la emulsión son:

1. Contacto entre las fases que forman la emulsión; los compuestos que reducen la tensión en interfases, reducen la energía necesaria para formar la emulsión dando como resultado un sistema más estable.
2. El tipo y características de algún compuesto que se adsorba en la interfase.
3. La tensión superficial que hay entre las dos fases, es el trabajo necesario para incrementar el área.
4. Tamaño y relación superficie-volumen de los glóbulos dispersos.
5. Relación peso-volumen de la fase continua y discontinua.
6. La viscosidad de la fase continua.

En las emulsiones aceite en agua, se presentan tres diferentes mecanismos que desestabilizan la emulsión y son :

Cremado: Se refiere a la separación de las partículas de la emulsión por diferencia de densidad con el medio que las rodea, ascendiendo a la superficie para formar una zona rica en partículas grasas, más no está constituida por la parte oleosa libre. El cremado se da generalmente en soluciones concentradas de 10 a 50 % y cuando el tamaño de glóbulos grasos es superior a 2 micras el cremado obedece a la Ley de Stokes, que nos dice que la velocidad de sedimentación de una partícula esférica en un líquido está dada por (Fennema, 1985) :

$$V = 2 gr^2 (d_1 - d_2) / 9\eta$$

Donde: V = velocidad de sedimentación
g = aceleración de la gravedad
r = radio de la gota
d1 = densidad de la esfera
d2 = densidad del líquido
η = viscosidad del líquido.

Floculación: En este fenómeno las gotas dispersas forman agregados debido a la atracción de sus cargas eléctricas superficiales. Las gotas agregadas prevalecen intactas sin afectar su membrana. La floculación ocurre cuando el tamaño de partícula es menor a 1 micra y las soluciones son concentradas en cantidades menores del 5 %.

Coalescencia: Consiste en la combinación de agregados formados en la floculación para dar como resultado gotas unitarias de mayor tamaño. Es la forma más importante de desestabilización de una emulsión, ya que la capa interfacial que rodea a los glóbulos se adelgaza y se rompe, dándole carácter reversible al proceso y da como resultado la desemulsificación completa (Charley, 1987).

La estabilidad de una emulsión también se ve afectada por cambios de temperatura, campos eléctricos, pH, fuerza iónica o daños mecánicos (Fernema, 1985).

AGENTES EMULSIFICANTES

Los emulsificantes pertenecen a un grupo de compuestos denominados surfactantes.

Los emulsificantes naturales incluyen los fosfolípidos, lecitina (fosfatidil colina), y fosfatidil etanolamina. Los fosfolípidos son derivados de la grasa, en la cual, en lugar de un ácido graso, se esterifica el ácido fosfórico con glicerol en uno de los átomos de carbono terminales. Los radicales de los ácidos grasos particulares unidos a los otros dos átomos de carbono del glicerol, dependen de la fuente del fosfolípido. Generalmente, uno de los dos ácidos grasos se encuentra insaturado. Unida a la molécula del fosfolípido en uno de los grupos hidroxilos del residuo del ácido fosfórico, se encuentra la colina, que da lugar a lecitina, o etanolamina, o serina, las cuales dan lugar a la fosfatidil etanolamina o fosfatidil serina, denominados estos dos últimos fosfolípidos como cefalinas.

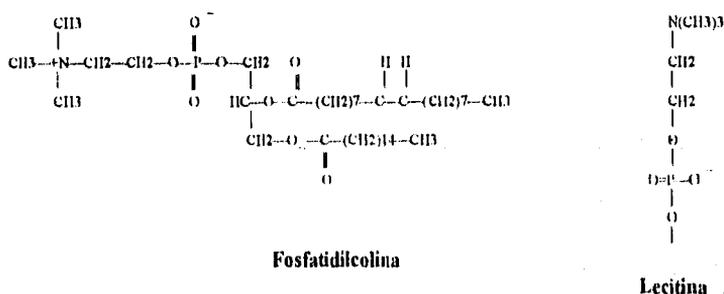
Un emulsificante u agente tensoactivo ayuda en la formación de una emulsión al:

- 1) Disminuir la tensión superficial de uno de los líquidos más que la del otro.
- 2) Evitar la coalescencia de las gotas evitando la agregación y,
- 3) Elevar la viscosidad de la fase continua por la adición de un polisacárido soluble, de forma que el proceso de coalescencia disminuya su velocidad al elevarse la viscosidad, retrasando los choques entre las partículas de la emulsión.

Los emulsificantes empleados en alimentos también se clasifican en: aniónicos, catiónicos, no iónicos, anfóteros y emulsificantes insolubles en agua. Su uso dependerá de la naturaleza química de la emulsión, de su disponibilidad y del costo. Para la elaboración de alimentos infantiles, el único emulsificante permitido es la lecitina, por ser un emulsificante natural (Codex Alimentarius, 1981).

se obtiene comercialmente del frijol de soya, y es de una mezcla de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidil inositol, además de pequeñas cantidades de triglicéridos, ácidos grasos y carbohidratos. La lecitina desempeña un papel muy importante en las propiedades de textura de los alimentos por la capacidad de actuar como emulsionantes debido a que su molécula contiene una parte hidrófoba y una hidrófila. El grupo fosfato y la base nitrogenada interaccionan con la fase acuosa, mientras que las cadenas hidrocarbonadas lo hacen con la fase lipídica, con lo que se logra un contacto físico más estrecho entre las dos fases inmiscibles.

Estructura de Lecitina y fosfatidilcolina:



ESTABILIZANTES.

Además de los agentes emulsificantes, se pueden estabilizar emulsiones utilizando macromoléculas y/o sólidos finamente divididos suspendidos en la fase continua.

Las partículas sólidas de tamaños similares a las gotas de aceite dispersas pueden estabilizar las emulsiones mediante su adsorción en la interfase, formando una barrera física alrededor de las gotas y evitando así el contacto entre ellas. La estabilidad de estas emulsiones depende de la capacidad de las dos fases para retener las partículas sólidas.

Los polisacáridos y las proteínas son capaces de formar capas alrededor de las gotas dispersas formando una barrera física e impidiendo la coalescencia. En el caso de las proteínas, el efecto de estabilización depende principalmente de las propiedades reológicas y espesor de la capa de proteína y de factores fisicoquímicos intrínsecos como la composición y secuencia de aminoácidos. Su peso molecular, la conformación y distribución de las cargas electrostáticas de la molécula.

Como la mayoría de las proteínas usadas en los sistemas alimentarios son solubles en agua, estabilizan mejor las emulsiones aceite en agua. Las proteínas capaces de ionizarse incrementan las fuerzas de repulsión electrostáticas aumentando así la estabilidad de la emulsión.

Para comparar las propiedades de emulsificación de diferentes proteínas se aplican principalmente dos pruebas que son: capacidad de emulsificación (EC) y estabilidad de la emulsión (ES) (Fennema, 1985).

La Capacidad de Emulsificación: es la cantidad máxima de aceite disperso en la fase acuosa, y se expresa:

$EC = \text{ml de aceite emulsificado} / \text{g de proteína.}$

Cuando la proteína ya no es capaz de emulsificar más aceite, ocurre una inversión de fases, la cual se detecta por el súbito cambio en la viscosidad, cambio en el color (si existe algún colorante presente) o por un incremento en la resistencia eléctrica.

La Estabilidad de la Emulsión: nos indica la eficiencia de la emulsión, y se expresa como:

$ES = \text{volumen final de emulsión} (100 / \text{volumen inicial de emulsión}).$

Las dos pruebas mencionadas reflejan el hecho de que las proteínas llevan a cabo dos funciones: ayudan a la formación de la emulsión disminuyendo la tensión interfacial y ayudan a estabilizarla al formar una barrera física en la interfase.

MATERIALES Y METODOS

Las proteasas propuestas inicialmente, en base a su disponibilidad y costos fueron las siguientes:

- 1) Neutrase 0.5 L (Novo, Biotecsa S.A. de C. V.)
- 2) HT- Protolytic 200 (Enmex S.A de C.V.)
- 3) Proteasa 2A (Amano Enzimas y Productos Químicos S.A.)
- 4) Papaina (Enmex S.A. de C.V.)
- 5) Proteasa N (Amano. Enzimas y Productos Químicos S.A.)
- 6) Alcalasa 0.6 L (Novo, Biotecsa S.A. de C.V.)
- 7) Alcalasa 2.4 L (Novo, Biotecsa S.A. de C.V.)

Estas enzimas fueron seleccionadas en base a los valores de pH y temperaturas en las cuales las enzimas presentan la mayor actividad, ver cuadro de enzimas No. 2.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA DE PROTEASAS

Para determinar la actividad enzimática de cada enzima se realizó lo siguiente:

Se utilizó como sustrato caseína grado reactivo (Casein Purified High. ICN Biochemicals, Inc.) al 2% en buffer de fosfatos 0.2M, pH 7.0, a una temperatura de 55°C.

La caseína se mezcló con buffer de fosfatos y se homogenizó utilizando un Ultraturax (Janke-Kunkel, mod. T25).

Se colocan 25 ml de caseína en un baño a 50°C, se agrega la enzima cuando la caseína se equilibra a esa temperatura. Una vez agregada la enzima se agita rápidamente y se toma inmediatamente una muestra de 3.0 ml, la cual se inactiva al verterse sobre 4.0 ml de ácido tricloro acético (TCA) al 5%.

Una vez inactivada la enzima se filtra con papel Whatman No. 42 y al filtrado se le mide proteína soluble por el método de Lowry. Esta muestra constituye el tiempo cero de la reacción.

Posteriormente se tomaron muestras a los tiempos: 5', 10', 15' y 20'. Cada corrida por duplicado.

Se preparo un blanco en las mismas condiciones que los anteriores sustituyendo la enzima por buffer de fosfatos

Calculo de la actividad enzimatica:

Con el objeto de expresar las actividades enzimáticas en un solo tipo de unidades, se procedió a ensayar las velocidades iniciales de las enzimas utilizadas en este trabajo con el siguiente protocolo:

Con los datos de proteína soluble del ensayo de Lowry, se construyen las gráficas de actividad (velocidades iniciales), para obtener las pendientes expresadas en miligramos de proteína soluble en un volumen de 1.0 ml por minuto de hidrólisis, y aplicando la fórmula:

$$m * V / C * \text{dil.1} * \text{dil.2} = \text{mg de proteína /min g enz.}$$

donde:

m = pendiente de la curva de proteína soluble expresada en mg prot / ml min.

V = volumen de sustrato

C = gramos enzima agregada al sustrato en la mezcla de reacción, en este caso 0.006 g

dil 1 = dilución hecha al agregar TCA (ácido tricloro-acético) para inactivar la enzima: 7/3 (4.0 ml de TCA por cada 3.0 ml de muestra).

dil 2 = dilución para el análisis de Lowry: 1/10 a 1/50 dependiendo de la enzima

Tomando en cuenta las diluciones realizadas, se aplico la fórmula para calcular los miligramos de proteína solubilizada por minuto por gramo de enzima.

Se ajustó la actividad a la enzima con la menor actividad sobre caseína, que en este caso fue la Neutrased 0.5L, esto con el fin de tener una comparación objetiva de actividades, expresadas en unidades consistentes.

Una vez que se ha determinado la actividad catalítica de la enzima puede ser expresada en "unidades de enzima".

Definición de unidad: una unidad de actividad son los gramos de proteína solubilizada por minuto por gramo de enzima, de acuerdo a la curva estandar de albumina bovina y bajo las condiciones estipuladas para el ensayo: 50 °C y el pH 7.0

Con estos datos es ahora posible llevar a cabo hidrólisis enzimáticas dosificando el mismo número de unidades de actividad para las distintas enzimas, y poder realizar comparaciones válidas entre ellas.

DETERMINACION DE PROTEINA SOLUBLE (LOWRY)

El porcentaje de proteína soluble de cada hidrolizado se determinó de la siguiente manera: se utilizó el método de Lowry (Lowry 1977) tomando una muestra del filtrado, después de inactivar la enzima y precipitar la proteína no solubilizada con ácido tricloro acético (TCA).

El método de Lowry se basa en la formación de un complejo colorido de cobre cuproso con el enlace peptídico de la proteína en presencia de tartrato de sodio y potasio (este evita la precipitación del cobre en el medio alcalino) e intensifica la coloración producida por la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con aminoácidos como tirosina, triptofano, y en menor grado cistina, cisteína e histidina, presentes en las proteínas. Esta coloración se midió espectrofotométricamente a 750 nm y se usó como referencia una curva patrón de albumina sérica bovina en concentraciones de 0 a 100 mg/ml.

SELECCION DE ENZIMAS

Calificación del sabor amargo de los hidrolizados:

Uno de los parámetros más importantes a evaluar en este trabajo es el sabor amargo proveniente de la hidrólisis, cuando esta proporciona péptidos con aminoácidos aromáticos o hidrofóbicos en un extremo amino terminal (Adler, 1986), para lo cual se probaron los hidrolizados, por análisis sensorial, procediendo a calificar con cruces el sabor obtenido cualitativamente en los hidrolizados con cada una de las enzimas en los distintos tiempos de hidrólisis.

Con base en experimentos preliminares realizados con caseinato de sodio y calcio (Arancia México), se intentó seleccionar de entre las enzimas propuestas (cuadro No. 2), únicamente a las que dieran como resultado un hidrolizado poco amargo y con una consistencia manejable. Los experimentos preliminares de hidrólisis se llevaron a cabo durante 23 horas con muestreos a las 0, 1, 3, 5, y 23 horas, respetando las condiciones de pH y temperatura recomendadas por el fabricante y utilizando 5.4 UA/ml como la dosis enzimática máxima.

HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LA CASEINA

La materia prima seleccionada para las formulaciones en este proyecto fue caseína (Arancia México) con un contenido de proteína de 85.5 %. El porcentaje de proteína se determinó por el método de microKjeldahl, utilizando un sistema de digestión y su unidad destiladora Kjeltec 1007 y 1002 respectivamente (Tecator, Prabin & Co. AB, Klippan, USA). La caseína se mezcló con buffer de fosfatos pH 7.0 a una temperatura de 55 °C en un homogenizador Ultraturax (Janke & Kunkel mod T25) a 24500 rpm durante dos minutos, para solubilizarla y se procedió a hidrolizar.

Las condiciones de hidrólisis fueron las siguientes:

- 1) Para la hidrólisis enzimática de la caseína se manejó el sustrato a una concentración de proteína del 5 %. Se preparon suspensiones con la caseína a una temperatura de 50 °C. Esta concentración permite un manejo adecuado de la materia prima y posteriormente una fácil formulación.
- 2) Los tiempos de hidrólisis ensayados fueron: 0, 30, 60 y 150 minutos.
- 3) Una concentración de 5.4 unidades de enzima. Esta concentración se eligió en base a ensayos preliminares llevados a cabo en el laboratorio que permiten obtener un hidrolizado de buen sabor y baja osmolaridad.

4) La temperatura de cada ensayo se fijó en 50 ° C, considerando que se encuentran cercanos a los valores óptimos de cada enzima (cuadro de enzimas No. 1), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

5) La enzima se incorporó al sustrato disuelta en buffer de fosfatos pH 7.0. Se decidió trabajar con este pH por ser el natural del sustrato y porque todas las enzimas presentan una buena actividad a ese valor.

Las hidrólisis se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 100 ml y se colocaron en una cámara de agitación y temperatura controladas (New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison NJ, U.S.A., Mod R-25). Se fijó la velocidad de agitación a 100 rpm que permitió mantener homogénea la mezcla de reacción en todo momento.

Una vez terminada la hidrólisis, las enzimas se inactivaron en horno de microondas (Samsung mod. Classic Collection MW8710) por 3 minutos a una temperatura de 80 °C, medida con la sonda de temperatura del equipo.

NIVEL DE PROTEINA SOLUBLE

Se determinó proteína soluble por el método de Lowry, descrito anteriormente, pero con la siguiente variante: en lugar de filtrar se centrifugó en un equipo Janetzi K 24 a 7 000 rpm por 10 minutos, lo que permite obtener un sobrenadante claro, que contiene la proteína soluble.

Los análisis se realizaron por duplicado, con tres réplicas cada uno y fueron expresados como los gramos de proteína solubilizada por 100 gramos de proteína original del sustrato, que se denomina como "grado de hidrólisis" para los efectos del presente trabajo.

El porcentaje de proteína soluble en cada hidrolizado se calculó como los gramos de proteína soluble por 100 g de proteína original del sustrato. Esta es una medida indirecta del grado de hidrólisis:

$$\% \text{ Proteína soluble} = \frac{\text{g de proteína solubilizada} \times 100}{\text{g de proteína original.}}$$

OSMOLARIDAD DE LOS HIDROLIZADOS

La osmolaridad de los hidrolizados se determinó en un osmómetro (Precision Systems Inc. Mod. Osmete 2007. Natick Mass, USA). El principio de la medición se basa en la disminución del punto de congelación de una solución, dependiendo de la concentración de solutos en la misma. El osmómetro se calibró utilizando estándares de 100 y 500 mOsm/kg.

Se tomaron alícuotas de 200 microlitros de la caseína hidrolizada con cada una de las enzimas y se realizó la medición por triplicado, en cada uno de los tiempos correspondientes: 0, 30, 90 y 150 min.

El procedimiento se puede apreciar en el diagrama de flujo del proyecto, fig. 1.

DIAGRAMA DE FLUJO

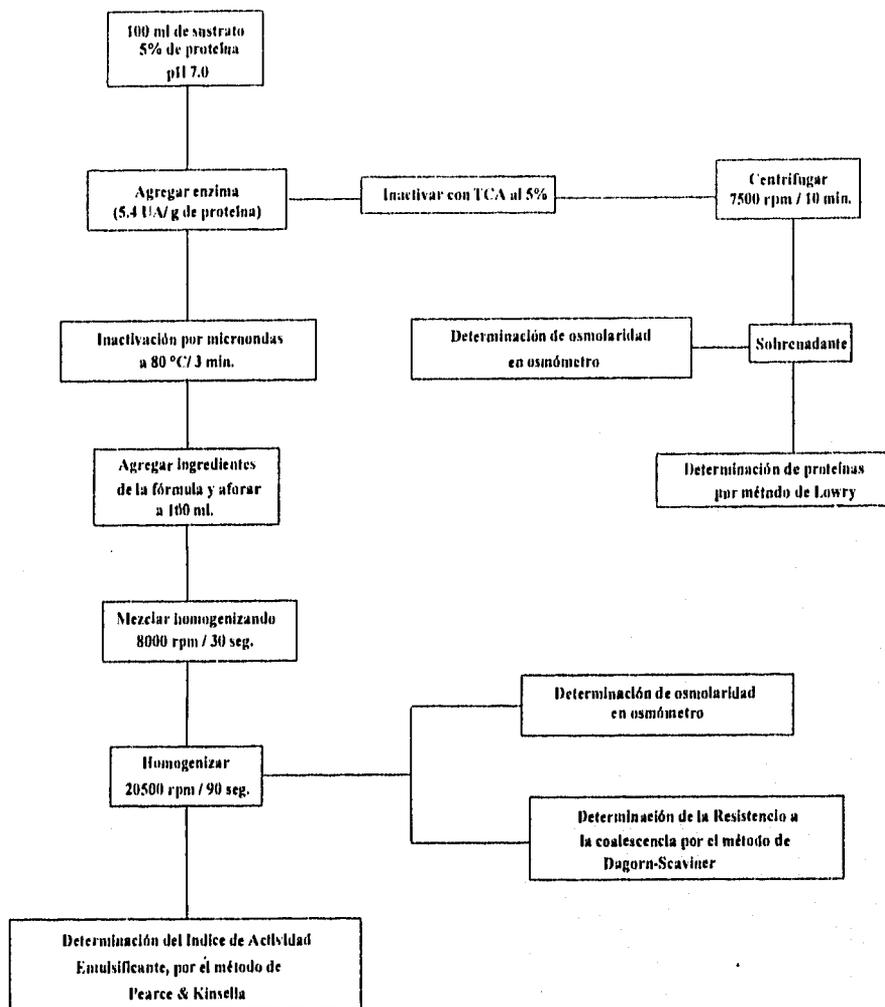


Fig. 1 Diagrama de flujo del proyecto: "Modificación enzimática de caseína para la modificación de sus propiedades funcionales".

DESARROLLO DE LA FORMULA

El hidrolizado se formuló con fuentes de carbohidratos y de lípidos para obtener una formulación completa en macronutrientes, de acuerdo con el cuadro No. 1, para posteriormente elaborar una formulación alimenticia, y basándonos en los resultados obtenidos de proteína soluble, realizados anteriormente, se propuso utilizar la siguiente formulación:

Cuadro No. 1 Fórmula modificada de caseína.

FORMULA		GRAMOS/100ml
PROTEINA:	CASEINA	3.00
LIPIDOS:	ACEITE DE MAIZ	3.66
	LECITINA	0.33
CARBOHIDRATOS:	SACAROSA	9.00

Fuente: Recomendación del Departamento de Nutrición del Hospital Infantil "Federico Gómez" para una formulación de uso general para pacientes hospitalizados.

Se utilizó lecitina de soya (LECSAM, Grado alimentario.SANBRA,S.A) como un emulsificante nutritivo que es aceptado como un ingrediente apto para ser aplicado en fórmulas alimenticias infantiles de acuerdo al Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 1981). La concentración máxima permitida es de 0.5g / 100 ml.

El nivel de lecitina utilizado en esta formulación fue de 0.33 g /100 ml, se aplicó en base a resultados previos de otras formulaciones elaboradas en el Departamento de Alimentos y Biotecnología (Appendini A., Pérez M., 1993; Lara, P., 1991, Rebolledo D.,1995), para otras fórmulas infantiles.

PREPARACION DE LAS EMULSIONES

Cada hidrolizado de caseína se mezcló con el resto de los ingredientes de la fórmula del cuadro No. 1 y se mezcló en un homogenizador Ultraturax a 24500 rpm durante 1 minuto 30 segundos.

Así mismo, una vez realizada la emulsión con la formulación, se midió la osmolaridad, para evaluar la contribución a la osmolaridad final que aporta la proteína solubilizada. La medición de la osmolaridad se realizó en las mismas condiciones que para el hidrolizado enzimático.

EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES

Una vez realizada la emulsión con la fórmula se determina:

Índice de Actividad Emulsificante, (IAE):

Es el área de superficie interfacial creada por gramo de proteína y es estimado de acuerdo a la técnica turbidimétrica de Pearce and Kinsella (1978).

Se midió de la siguiente manera:

Se toman 200 µl de la emulsión y se adicionan a una solución de dodecil sulfato de sodio al 0.1% y cloruro de sodio 0.1M a un pH de 7.0, el volumen final debe ser de 50 ml, por lo que se toma como una dilución 1/250.

Cada dilución se lee espectrofotométricamente a 500 nm (datos por triplicado, con 3 réplicas c/u), y se calcula con la fórmula:

$$\text{IAE} = \frac{2TD}{\varnothing C} = \text{m} / \text{g}$$

Donde:

T = turbidez = 2.303 y está dado por: A / l ; A, absorbancia de la emulsión; l, longitud de la celda.

D = dilución de la mezcla = 250 ml

∅ = fracción volumétrica de la fase dispersa (ml de aceite agregado/ 100) = 0.04 ml

C = concentración de la solución proteica en $\text{g} / \text{m}^3 = 53,300$

Resistencia a la Coalescencia, o Estabilidad Emulsificante:

Es determinado de acuerdo a la técnica de Dagom-Scaviner (1987):

Se mide el efecto estabilizante de la proteína contra la coalescencia, que es el aceite separado.

El método que aquí se describe permite cuantificar fácilmente el volumen de cremado y observar la separación de fases:

Se toman 45 ml aproximadamente, de la emulsión realizada con la fórmula, y se vacían a 4 tubos de ensayo volumétricos cónicos de 15 ml.

Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. al término de este tiempo, se sacan los tubos de la centrífuga y conociendo el volumen inicial de aceite en la emulsión se mide el volumen de aceite separado. Se determina la estabilidad a la coalescencia por medio de la fórmula:

$$EC = V_s / V_i \cdot 100$$

Donde:

V_s = volumen de aceite separado

V_i = volumen inicial de aceite añadido a la fórmula.

Para determinar el porcentaje de aceite separado se utiliza la fórmula:

$$\% AC = V_c / (V_t \cdot \emptyset) \cdot 100$$

Donde:

V_c = Vol. de aceite coalescido

V_t = Vol. total del tubo

∅ = Vol. parcial de aceite / Vol. total de emulsión.

El análisis estadístico de las calificaciones de cada emulsión se realizó mediante un diseño factorial usando un paquete estadístico SPSS-X (paquete estadístico para ciencias sociales-PC). El experimento se realizó por duplicado, de cada enzima, además de diferentes repeticiones. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rango múltiple (Duncan) empleando 95 % y 99% de niveles de significancia.

Además se observó al microscopio el tamaño de los glóbulos de grasa. El un microscopio contaba con ocular y objetivo micrométricos para establecer el valor en micras del diámetro de los glóbulos de grasa. Se tomó una gota de las emulsiones con la o las enzimas seleccionadas, y se colocó en un portaobjetos, para su observación.

Una vez definidas las condiciones óptimas de hidrólisis que permitieron la formación de una emulsión estable, eligiendo la enzima que proporcionó las mejores características para el propósito determinado.

RESULTADOS Y DISCUSION

A las enzimas propuestas (cuadro 2), se les midió la actividad enzimática, y posteriormente se realizó la hidrólisis.

Cuadro No. 2. Enzimas proteolíticas consideradas para el proyecto: *

Enzima	Origen	Actividad reportada	pH	T °C
Alcalase 0.6 L	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.6 a	7.0	50
Alcalase 2.4 L	<i>Bacillus licheniformis</i>	2.4 a	7.0-9.0	50
HT-Proteolytic	<i>Bacillus subtilis</i>	200 b	7.0	50-55
Neutrased 0.5 L	<i>Bacillus subtilis</i>	0.5 a	7.0	50
Papaina	<i>Carica papaya</i>	100-1,300 c	6.0-7.5	50
Proteasa 2A	<i>Aspergillus oryzae</i>	más de 20,000 d	7.0	50
Proteasa N	<i>Bacillus subtilis</i>	más de 150,000 e	7.0	50-55

La temperatura y pH, es el óptimo de las respectivas enzimas a excepción de la Alcalasa 2.4 L y la Papaina. por el nivel de tolerancia que tienen, se decidió trabajar a pH 7.0 (Whitaker, 1977).

Las unidades de actividad están dadas de acuerdo al las siguientes especificaciones:

- a.- 1 UA = gramos de tirosina liberada por gramo de enzima
- b.- 1 UA = gramos de enzima necesarios para hidrolizar 40 % de caseína en 60 minutos, pH 7.4 y 40 °C.
- c.- 1 UA = gramos de tirosina liberada por ml o mg de enzima.
- d.- 1 UA = gramos de enzima necesarios para liberar 100 microgramos de L-tirosina en 1 ml de filtrado a pH 7.0.
- e.- 1 UA = gramos de tirosina liberada por gramo de enzima a pH 7.0. de filtrado a pH 7.0.

* Tomado de:

- Protease Amano 2A. Technical Bulletin Amano International Enzyme Co.
- Enzymatic modification of proteins using Novo Proteases. Novo Nordisk.

Para medir actividad enzimática se hicieron diluciones de los hidrolizados con las siguientes enzimas (por no entrar en el rango de la curva patrón):

Alcalase 2.4L dil. 1/10, Papaina dil 1/50, Proteasa 2A dil 1/50, Proteasa N dil 1/50 y dil 1/10.

RESULTADOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Las actividades enzimáticas determinadas sobre caseína para cada una de las enzimas evaluadas se presenta en la cuadro No. 3.

Cuadro No. 3. Resultados de actividad enzimática de las diferentes enzimas.

Enzima	Actividad sobre caseína mgprot./min g enz.	Actividad ajustada a Neutrase 0.5L mgprot./min g enz.
Alcalase 0.6 L.	202.10	0.9192
Alcalase 2.4L.	2,324.25	0.0799
HT-Proteolytic	10,561.00	0.0175
Neutrase	185.79	1.0000
Papaina	1,198.78	0.1549
Proteasa 2A	653.52	0.2842
Proteasa N	556.65	0.3337

Estos resultados permiten dosificar de una forma apropiada las distintas enzimas.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Los resultados de la proteólisis fueron evaluados en este proyecto, con respecto a la solubilidad y tomando en cuenta la formación de péptidos amargos, la osmolaridad del hidrolizado siempre y cuando se mantuviera una buena capacidad del hidrolizado para formar emulsiones estables.

De las enzimas propuestas inicialmente se descartaron la Neutrase 0.5 L, HT-Proteolytic-200, Papaina, y Alcalasa 2:4 L (ver cuadro de enzimas No. 2); a causa del sabor amargo de los hidrolizados. Con respecto a la Alcalasa, su pH óptimo es de 9.0, valor que se encuentra 2 unidades arriba del pH 7.0 del sustrato con que se trabajó, para mantener el pH lo más cercano al pH natural

de las suspensiones de caseína. Trabajar con proteínas a valores de pH tan elevados (9.0) no es tan conveniente puesto que podría ocasionar una disminución del valor nutricional por la destrucción de aminoácidos indispensables, racemización y el desarrollo de uniones entre algunos aminoácidos para formar lisino-alanina o la ornitino-alanina (Satterlee L.D., 1984).

Con los resultados cualitativos del sabor de los hidrolizados sobre caseinatos (cuadros 4 y 5) fue claro que las enzimas: Proteasa N, Proteasa 2A y las Alcalasas, son las que producen sabores más suaves, y por lo tanto fueron las seleccionadas.

Cuadro No. 4. Resultados cualitativos sobre el sabor de los hidrolizados para caseinato de sodio.

Enzima / Tiempo de hidrólisis	0 hrs.	1 hrs.	3 hrs.	5 hrs.	23 hrs.
PROTEASA N	+	+	++	++	++++
PROTEASA 2A	+	+	+	++	++++
ALCALASA 0.6 L	+	+	++	++	++++
ALCALASA 2.4 L	+	+	++	+++	++++
NEUTRASE 0.5L.	+	++	+++	+++	++++
PAPAINA	+	++	+++	+++	++++
HIT-PROTEOLYTIC	+	++	+++	+++	++++

En donde:

+ = característico

++ = ligeramente amargo

+++ = amargo

++++ = muy amargo

De estos resultados se seleccionaron a las siguientes enzimas:

Alcalase 0.6L, Alcalase 2.4L, Proteasa 2A y Proteasa N

Cuadro No. 5. Resultados cualitativos sobre el sabor de los hidrolizados para caseinato de calcio.

Enzima / Tiempo de hidrólisis	0 hrs.	1 hrs.	3 hrs.	5 hrs.	23 hrs.
PROTEASA N	+	+	++	++	++++
PROTEASA 2A	+	+	++	+++	++++
ALCALASA 0.6 L	+	+	++	++	+++
NEUTRASE 0.5L	+	++	+++	++++	++++

En donde:

+ = característico

++ = ligeramente amargo

+++ = amargo

++++ = muy amargo

De estos resultados se eligieron las siguientes enzimas para caseinato de calcio:

Alcalasa 0.6L y Proteasa N

En los hidrolizados de ambos caseinatos, sólo se tomó en cuenta la presencia de sabor amargo, pues es uno de los parámetros importantes a evaluar. En los experimentos preliminares realizados con caseinatos en el laboratorio se obtuvieron hidrolizados de consistencia chiclosa, difícil de manejar, por lo que se decidió trabajar con caseína para mantener una mejor consistencia.

La generación de péptidos amargos depende de varios factores como son: la naturaleza y especificidad de la proteasa utilizada, el tiempo de hidrólisis y también el número de aminoácidos hidrofóbicos y aromáticos en la cadena polipeptídica. Así que el objeto de realizar la selección de las proteasas era encontrar una que produjera el menor sabor amargo posible, y depende de la enzima utilizada, el tiempo de hidrólisis, y también puede deberse a la hidrofobicidad de la proteína y a la naturaleza de las proteasas utilizadas y su especificidad. El sabor de los hidrolizados se determinó cualitativamente calificando a las diferentes enzimas y al grado de hidrólisis en que se presenta este

sabor amargo. En el cuadro No. 6 podemos observar los resultados del sabor detectado en la hidrólisis de caseína.

Cuadro No. 6. Resultados cualitativos sobre el sabor de los hidrólizados para caseína.

Enzima / Tiempo de hidrólisis	0 min.	30 min.	90 min.	150 min.
PROTEASA N	+	++	+++	++++
PROTEASA 2A	+	+	++	+++
ALCALASA 0.6 L	+	++	++++	+++++

En donde:

+ = característico

++ = ligeramente amargo

+++ = amargo

++++ = más amargo

+++++ = muy amargo

Observamos que hay diferencia significativa entre las hidrólisis, y la hidrólisis realizada con la enzima Proteasa 2A es la más adecuada hasta este punto, ya que el sabor amargo se percibe ligeramente en los 90 minutos de hidrólisis. De la misma forma la Proteasa N, y la Alcalasa 0.6 L en 30 minutos, presentan un sabor ligeramente amargo.

Los resultados de la evaluación de la proteína soluble de cada uno de los hidrolizados, estimados a partir del método de Lowry se presentan en el cuadro No. 7 para las tres enzimas seleccionadas: **Proteasa N, Proteasa 2A y Alcalasa 0.6 L**, en donde se observa que la cantidad de proteína soluble se incrementa con el grado de hidrólisis, esto también lo podemos ver en la Figura 2. El incremento en proteína soluble se obtiene al medir los péptidos de bajo peso molecular solubles en TCA. Las tres enzimas aquí ensayadas son proteasas que presentan un patrón de hidrólisis tipo endo y una amplia especificidad sobre los sustratos. La excepción la marca la proteasa 2A que en las especificaciones del fabricante está clasificada como exo. Al observar el perfil de la hidrólisis (fig. 2), la proteasa 2A es ligeramente más alto, pero no mucho muy distinto de las otras dos enzimas

consideradas como endo-proteasas. El método utilizado para evaluar la proteína soluble, después de precipitar los péptidos de alto peso molecular con TCA, determina péptidos solubles generados durante la hidrólisis y que son de relativo bajo peso molecular. Esto nos indicaría que las enzimas podrían hidrolizar extensivamente al sustrato. Sin embargo en reacciones aún de 150 minutos el grado de hidrólisis no sobrepasa el 20% de proteína solubilizada en ninguno de los casos se empieza a formar una especie de precipitado elástico que impida la solubilización de la proteína.

Así mismo se realizó un control de caseína sin enzima en las mismas condiciones que a los hidrolizados enzimáticos, al que se le realizaron las mismas pruebas para medir proteína soluble, sabor, osmolaridad, estabilidad de las emulsiones e índice de actividad emulsificante.

Durante la inactivación de la enzima también se provoca una desnaturalización de la proteína y una posterior agregación.

Osmolaridad: la osmolaridad es una función del número y tamaño de las partículas moleculares e iónicas presentes en un volumen dado e incluyen electrolitos minerales, proteínas, péptidos o aminoácidos, hidratos de carbono y lípidos. Se expresa en función de la presión que ejercen las moléculas sobre las membranas expresadas en miliosmoles/litro (mOsm/L), cuando se habla de las características osmóticas de los líquidos corporales (Ganong, 1994). Los resultados de la evaluación de la osmolaridad de cada uno de los hidrolizados, se presentan en el cuadro No 7, y el perfil que sigue se observa en la figura 3.

CURVAS DE PROTEINA SOLUBLE

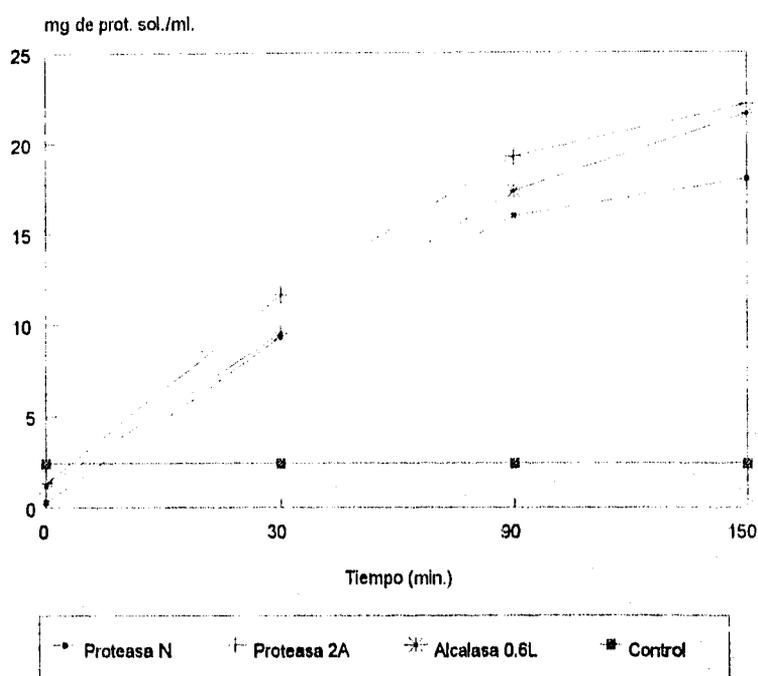


Fig.2. Curvas de proteína soluble del hidrolizado con diferentes proteasas y diferentes tiempos de hidrólisis. Condiciones de reacción : S= 5.0 % , E/S = 5.4 UA/g , pH = 7.0, en Buffer de fosfatos 0.1 M, T= 50 °C.

CURVAS DE OSMOLARIDAD DEL HIDROLIZADO

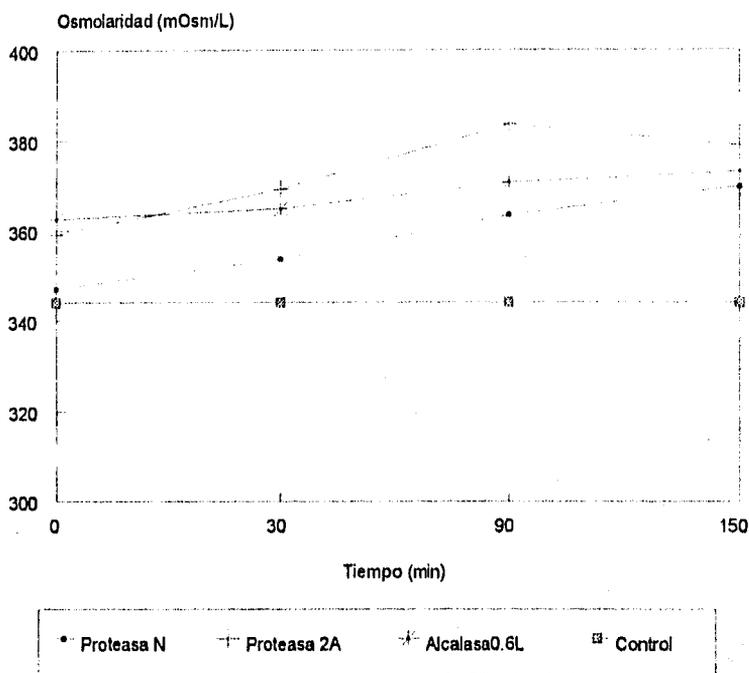


Fig 3. Curvas de osmolaridad del hidrolizado con diferentes proteasas y diferentes tiempos de hidrólisis. Condiciones de reacción : S= 5.0 % , E/S = 5.4 UA/g , pH = 7.0 , en Buffer de fosfatos 0.1 M, T= 50 °C.

Cuadro No. 7 Resultados de proteína soluble y osmolaridad del hidrolizado.

Tratamiento	UA / g	Tiempo	Proteína soluble	Osmolaridad
Enzima	de caseína	(minutos)	%	mOsm/L
PROTEASA N	5.4	0	0.182	347.0
	5.4	30	8.020	353.7
	5.4	90	13.310	363.4
	5.4	150	15.460	369.7
PROTEASA 2A	5.4	0	1.120	359.1
	5.4	30	9.950	369.1
	5.4	90	16.500	383.6
	5.4	150	18.880	378.8
ALCALASA 0.6 L	5.4	0	0.970	362.5
	5.4	30	8.170	364.8
	5.4	90	14.860	370.6
	5.4	150	18.360	373.0
CONTROL (sin enzima)	0.0	0	2.070	344.0
	0.0	30	2.070	344.0
	0.0	90	2.070	344.0
	0.0	150	2.070	344.0

Los resultados son el promedio de tres réplicas y están expresados como los gramos de proteína solubilizada por 100 gramos de proteína original del sustrato, que se denomina como el " grado de hidrólisis" para los efectos del presente trabajo.

La temperatura utilizada de 50 °C, es lo suficientemente alta para disminuir el riesgo de una posible contaminación microbiana durante el proceso de hidrólisis. El grado de agitación se mantuvo constante en 100 rpm, lo que permitió una adecuada interacción de la enzima con el sustrato.

Las tres enzimas seleccionadas se encuentran disponibles en el mercado mexicano, los costos se indican en el cuadro No. 8 de la siguiente página.

Cuadro No. 8 Costos por Kg de enzima de: Proteasa N y Proteasa 2A; y de Alcalasa 0.6L.

ENZIMA	COSTO
Proteasa N	\$ 364 USD / Kg
Proteasa 2A	\$ 163 USD / Kg
Alcalasa 0.6 L.	\$37.50 USD/L

Cotización hasta 1996.

DESARROLLO DE LA FORMULA

A partir de la hidrólisis enzimática de caseína se esperaba obtener un hidrolizado de fácil absorción para pacientes hospitalizados y que en general requiere de este tipo de productos, con un sabor lo menos amargo posible y un nivel de proteína soluble que permita una absorción mejorada pero que no presente una osmolaridad demasiado elevada, (aproximadamente 430mOsm/L) en la fórmula completa.

La selección de las condiciones de hidrólisis se hizo en función de la presencia de sabor amargo cuadro No.6, y en base a la osmolaridad (cuadro No.7) con cada una de las enzimas seleccionadas, ya que el nivel de proteína soluble varía muy poco entre las tres enzimas seleccionadas.

Para elaborar las emulsiones con la formulación elegida (cuadro No.1), se realizó lo siguiente:

Se propuso utilizar maltodextrinas (sólidos de jarabe de maíz) en un nivel de formulación del 10% a fin de disminuir la osmolaridad, ya que son fácilmente digeridas por las enzimas pancreáticas obteniéndose maltosa e isomaltosa, que se absorben rápidamente en el intestino delgado y se evita un uso exagerado de sacarosa. Los pacientes en las condiciones de desnutrición normalmente tratados en el Departamento de Desnutrición y Gastroenterología del Hospital Infantil, poseen una función pancreática suficiente para lograr la digestión de este tipo de carbohidratos. Además la fórmula que

contiene sacarosa como única fuente de carbohidratos presenta altos niveles de osmolaridad que se verían incrementados ahora por el uso de los hidrolizados. Esto aumenta la posibilidad de diarrea osmótica en algunos pacientes.

En el mercado nacional Arancia S.A. de C.V. se comercializa una amplia gama de maltodextrinas que varían en D.E. (dextrosa equivalente) entre 10 y 60.

En este trabajo se seleccionó la maltodextrina del menor D.E = 10 para evitar en lo posible los problemas de higroscopicidad que caracterizan a las maltodextrinas de menor peso molecular, y en base a pruebas realizadas en el laboratorio, así como para no contribuir en forma importante a la osmolaridad del producto final.

La fórmula modificada de caseína requiere de un contenido de lípidos del 4 %, que es un valor mayor al de la leche y de algunas fórmulas comerciales del mercado. Los resultados preliminares obtenidos en el Hospital Infantil indican una mayor tolerancia a los lípidos corroborando lo reportado por Jirapinyo y col. (1990).

Cuadro No. 9 Niveles de fórmulas comerciales. *

FORMULA	OSMOLARIDAD (mOsm /L)
Vivonex (Norwich Pharmacal)	810
Nutramigen (Mead - Johnson)	443
Pregestimil (Mead - Johnson)	590
Vital (Ross)	450

*Koretz and Meyer. Gastroenterology. Vol.78 No.2, pp 395.

En el cuadro No.10 se presentan los valores de osmolaridad determinados experimentalmente para la formulación.

Cuadro No. 10 Osmolaridad de la formulación.

Enzima	Tiempo de Hidrólisis (min.)	Osmolaridad de la Formulación mOsm/l
PROTEASA N	0	393.8
	30	404.1
	90	414.7
	150	424.5
PROTEASA 2A	0	397.6
	30	427.4
	90	439.0
	150	445.4
ALCALASA 0.6 L	0	396.1
	30	409.5
	90	427.5
	150	439.6
CONTROL	0-150	393.2

El hidrolizado logró ser mantenido por la hidrólisis controlada a los niveles más bajos posibles de osmolaridad para una proteína hidrolizada (predigerida), la contribución de los otros ingredientes es baja y no alcanza a rebasar los niveles de las formulaciones comerciales del cuadro 9. El perfil de la osmolaridad de la fórmula se aprecia en la figura 4.

CURVAS DE OSMOLARIDAD DE LA FORMULA

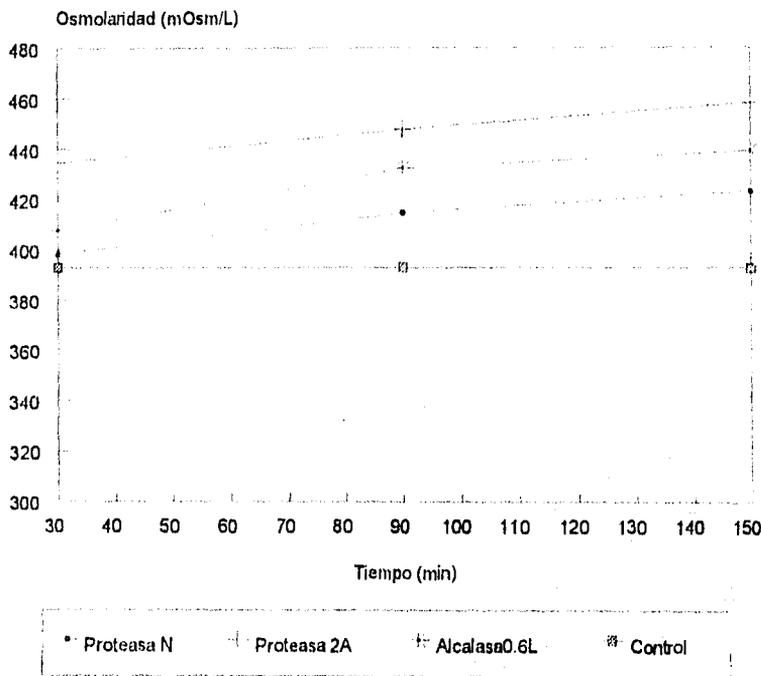


Fig.4. Curvas de osmolaridad de la formulación con diferentes proteasas y diferentes tiempos de reacción. La fórmula se realizó a partir de hidrolizado enzimático, S= 5.0 % , E/S 5.4 UA/g , pH = 7.0 , en Buffer de fosfatos 0.1 M, T= 50 °C. Con una concentración de proteína del 3.0 % , para la elaboración de la fórmula.

EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE LAS EMULSIONES

Para medir la estabilidad de la emulsión se aplicaron dos métodos descritos anteriormente: Índice de actividad emulsificante (IAE), que se determina turbidimétricamente según técnica de Pearce and Kinsella, con el cual se realiza un análisis estadístico; y el de resistencia a la coalescencia o estabilidad emulsificante, (Dargon-Scaviner, 1987); donde se mide el efecto estabilizante de la proteína contra la separación de aceite, volumen de cremado, floculación y coalescencia. La proteína juega un papel importante ya que después de la hidrólisis, resulta más flexible y es capaz de recubrir la superficie de las partículas de aceite estabilizando la emulsión.

Los tiempos de hidrólisis y la concentración de enzima presentan una interacción altamente significativa, lo que indica que ambas variables influyen de manera conjunta sobre la estabilidad de las emulsiones y cuyos efectos no deben verse aislados. Sin embargo el porcentaje de solubilización tampoco debe verse aisladamente, ya que tiene una fuerte influencia en la estabilidad. Al alcanzar altos grados de hidrólisis se eleva el porcentaje de proteína soluble, pero los péptidos son de menor peso molecular incapaces de formar una capa que alcance a cubrir toda la superficie de los glóbulos de grasa, resultando así emulsiones menos estables, y no se obtiene la misma calidad de emulsiones. Esto implica que la estabilidad está más bien basada en la existencia de péptidos de un cierto peso molecular, obtenidos con una hidrólisis controlada. Si la proteasa tiene asociada una fuerte actividad exo produciría una mayor cantidad de péptidos de bajo peso molecular que no tendrían la capacidad de desdoblarse y recubrir los glóbulos de grasa correctamente, lo que no se vió con la enzima Proteasa 2A.

INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE

El índice de actividad emulsificante es característico de todo el sistema, no solo de la proteína empleada, y es afectado por el tipo de aparato usado para la formación de la emulsión, el tiempo, el tipo de aceite y el volumen total de la emulsión (Chobert, 1988).

En el cuadro 11 se observa los resultados entre las enzimas, el perfil de la gráfica del IAE se observa en la fig. 5 de la siguiente página.

El análisis estadístico del IAE muestra que los resultados que se obtuvieron no varían mucho entre las enzimas con respecto a los diferentes tiempos de hidrólisis, es decir que entre la Proteasa N y la proteasa 2A a un nivel de significancia de 0.1, no hay diferencia significativa, pero haciendo una comparación de estas enzimas con respecto a la Alcalasa 0.6L sí muestran una diferencia significativa a un nivel de 95 % y 99%, según el análisis estadístico.

La Proteasa N presentó mejores resultados como podemos observar en el cuadro No. 11 de índice de actividad emulsificante, después la Proteasa 2A, y por último la Alcalasa 0.6 L.

El análisis estadístico de Proteasa N muestra para la prueba de rango múltiple (DUNCAN), que hay diferencia significativa entre los tiempos de 90 y 150 minutos. El mejor tiempo con esta enzima es de 30 minutos de hidrólisis, como se vió anteriormente por el sabor ligeramente amargo. En cambio el análisis estadístico de Proteasa 2A para la prueba de rango múltiple (DUNCAN), nos indica que el mejor tiempo de hidrólisis es el de 90 minutos. El análisis estadístico también muestra que existe un efecto lineal del tiempo sobre la estabilidad de las emulsiones, a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, la estabilidad aumenta.

Basándonos en los resultados del análisis estadístico se evaluaron las condiciones de proteólisis sobre la estabilidad de las emulsiones.

Cuadro No. 11 Resultados del Índice de Actividad Emulsificante

Enzima	Tiempo de Hidrólisis (min.)	IAE (g/m)
PROTEASA N	0	46.46
	30	54.77
	90	59.49
	150	64.09
PROTEASA 2A	0	38.78
	30	41.66
	90	60.57
	150	70.69
ALCALASA 0.6 L	0	38.30
	30	38.50
	90	40.45
	150	52.13
CONTROL *	0-150	38.29

* El control tiene los mismos resultados para todos los tiempos.

Por lo tanto las condiciones de hidrólisis escogidas en base al análisis estadístico y en base a la estabilidad de las emulsiones fueron:

Enzimas: Proteasa N 30 minutos, y Proteasa 2A 90 minutos.

Concentración E/S: 5.4 UA/g, ambas.

El grado de hidrólisis a estas condiciones fué el más adecuado en todos los hidrolizados, ya que permitió una mejor estabilización de la emulsión y coinciden además con la preselección hecha a base del sabor amargo reportado en el cuadro 6. De esta manera se eligieron las condiciones óptimas de la hidrólisis para estabilizar la formulación y caracterizaciones.

INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE

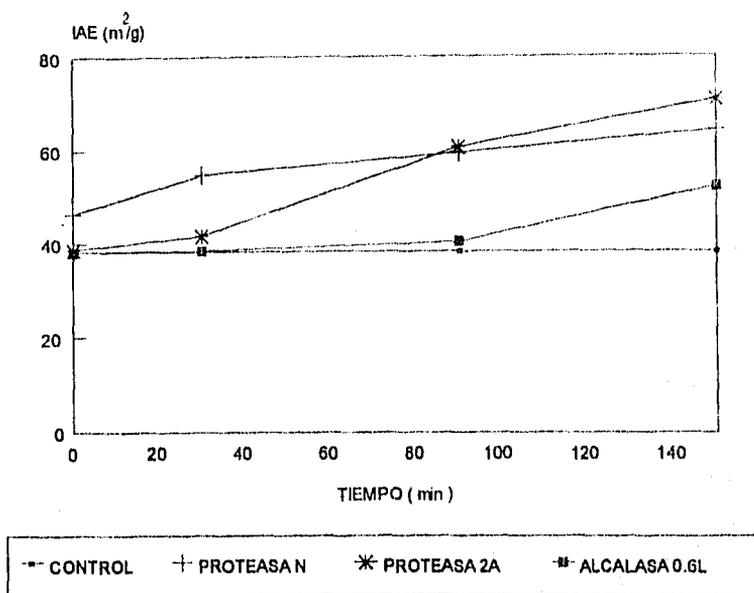


Fig: 5. Curvas del Índice de actividad emulsificante con diferentes proteasas y diferentes tiempos de hidrólisis. La fórmula se realizó a partir de hidrolizado enzimático, S= 5.0 %, E/S = 5.4 UA/g, pH = 7.0 , en Buffer de fosfatos 0.1 M, T= 50 °C, con una concentración de proteína del 3.0 %, para la elaboración de la fórmula.

RESISTENCIA A LA COALESCENCIA Y ESTABILIDAD EMULSIFICANTE.

La proteína hidrolizada juega un papel importante, ya que siendo más flexible (después de la hidrólisis) es capaz de recubrir una mayor superficie de las partículas de aceite estabilizando de esta forma la emulsión.

De las enzimas elegidas : Proteasa N, Proteasa 2 A y Alcalasa 0.6 L, se obtuvieron emulsiones estables a los tiempos de hidrólisis de: 30, 90 y 150 min., aunque el tiempo de duración de la emulsión es aproximadamente el mismo para todos los hidrolizados, en observaciones que no fueron cuantificadas en este trabajo, se observó también que mientras más hidrolizada está la proteína más tiempo perdura la emulsión, es decir, que una emulsión realizada a un tiempo de hidrólisis de 30 minutos es menos estable que una emulsión de 90 y 150 minutos, pero una emulsión con un tiempo de hidrólisis de 90 minutos dura aproximadamente el mismo tiempo que una de 150 minutos. Debe mencionarse que las hidrólisis exhaustivas (>5 hrs.) pierden completamente su estabilidad.

En el tiempo cero las emulsiones se rompen con más facilidad, esto puede ser por que la proteína no está hidrolizada, y tiene una menor flexibilidad para recubrir los glóbulos de grasa, y a causa de la coalescencia de las gotas, y por la fuerza de atracción que desestabilizan la emulsión. Esto se comprobó posteriormente con la observación en el microscopio donde se observaron glóbulos de grasa de mayor tamaño, y más variables (100-1000 μ), en las emulsiones hechas con caseína sin hidrolizar, ver resultados más adelante.

La estabilidad de una emulsión sometida a centrifugación es inversamente proporcional al nivel de aceite liberado de la emulsión, según el método de Pearce and Kinsella. En este trabajo las emulsiones observadas no liberaron aceite.

Al realizar la centrifugación se observó una separación de fases muy característica: la que corresponde al **volumen de cremado**, que es una fracción grasa más concentrada aún en forma de emulsión, que asciende a la superficie. La **fase líquida** que ocasionalmente presentaba grumos en

suspensión y que eventualmente se separan dejando una fracción líquida que es menos concentrada, y **el precipitado** que en este caso es muy escaso y se encontraba en el fondo del tubo.

Para facilitar la medición de las fases, la centrifugación se realizó en tubos graduados, y tomando en cuenta el volumen con respecto al total se encontraron proporciones de aproximadamente un 20 % para el volumen de cremado y un 80 % para la fase líquida (el precipitado está incluido en esta fase), tomando en cuenta el total del tubo.

Se realizó además un control con proteína intacta en las mismas condiciones que los anteriores, las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

Comparando las emulsiones con el control, en este se observó un volumen menor de cremado (10 % aproximadamente), esto quiere decir que la emulsión se ve favorecida por la hidrólisis enzimática, ver figura 6.

En todas las emulsiones con las respectivas enzimas se observaron valores similares: el volumen de aceite separado en la superficie de las emulsiones, en todos los tiempos, con las respectivas enzimas, es casi nulo, lo que nos indica que las emulsiones son muy estables, y que la proteína tiene buena capacidad emulsificante, y la cantidad de proteína utilizada también es la adecuada. Por lo tanto no se evalúa el porcentaje de aceite separado, ya que no se distingue la diferencia de aceite separado desde 0 a 150 minutos en ninguna de las enzimas, y por lo tanto se decidió trabajar las emulsiones con exceso de aceite.

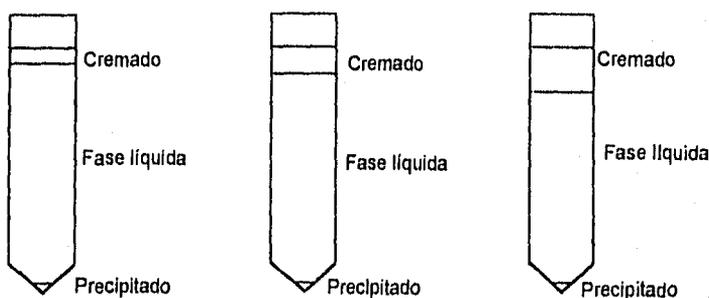
Emulsiones con exceso de aceite:

Se realizaron emulsiones con exceso de aceite (volumen de 25 ml de aceite total), siguiendo la misma metodología que las emulsiones realizadas con la fórmula, esto con el fin de observar la capacidad de la proteína y para observar si hay separación de aceite en la emulsión y poder cuantificarlo y

observar también las fases que se originan en estas emulsiones con exceso de grasa, comparando con las anteriores.

Los resultados de estas emulsiones, son similares a las emulsiones realizadas con la fórmula, es decir, no se observa separación de aceite, lo que se observa es que el volumen de cremado es mayor en estas emulsiones, esto significa que cuando el aceite se separa en gotas que se encuentran estabilizadas por una capa del emulsificante (la proteína hidrolizada + lecitina en este caso), el aceite se inmoviliza y pierde su fluidez. A medida que se incorpora más aceite, las gotas se hacen más numerosas y aumenta el área interfacial entre el aceite y el agua.

Tomando en cuenta lo anterior se observaron nuevos valores en las fases de separación: 30 % del volumen de cremado y 70 % de la fase líquida, pues aumenta el volumen de cremado. El control presenta una marcada diferencia con todas las emulsiones hechas con hidrolizados: se observó un valor del 15 % en volumen de cremado y un 85 % de fase líquida. No se reportan datos de resistencia a la coalescencia por que se considera como cero, ya que no se observa aceite separado en ninguna de las emulsiones incluyendo a todas las enzimas.



Dibujo 1 Control.
de emulsion normal.

Dibujo 2 emulsión normal.

Dibujo 3 emulsión con exceso de
aceite.

Fig. 6. Representación esquemática de los dos tipos de emulsiones, el dibujo 1 es el control para las emulsiones realizadas con la formulación, dibujo 2 para las emulsiones realizadas con la formulación, dibujo 3 para las emulsiones realizadas con exceso de aceite.

RESULTADOS DE LA OBSERVACION DE GLOBULOS DE GRASA

En las muestras diluidas de todas las enzimas con sus respectivos tiempos, se observan los mismos resultados: glóbulos que miden entre 200 y 400 micras.

Comparando estas observaciones con las emulsiones con exceso de aceite, se observa que el tamaño de glóbulos de grasa es igual, es decir, que los glóbulos miden entre 200 y 400 micras, pero se observa que el número de glóbulos presentes es mayor, lo que implica a su vez por qué el volumen de cremado es mayor en estas emulsiones, es decir que al aumentar la cantidad de aceite, aumenta el área interfacial entre el aceite y el agua, y el agregar más aceite no significa que los glóbulos sean más grandes o pequeños.

Con respecto al control, se observa que el tamaño de glóbulos varían desde 100 hasta 1000 micras, se observa también a muchos glóbulos de grasa agrupados, lo que indica que hay un fenómeno de agregación, esto explica por qué la emulsión en estas condiciones es menos estable, ya que a causa de la coalescencia de las gotas, y por la fuerza de atracción se desestabiliza la emulsión.

CONCLUSIONES

La hidrólisis parcial con proteasas mejoró las propiedades funcionales de la proteína. Los resultados muestran que los tiempos cortos de hidrólisis fueron más adecuados por el desarrollo de sabor amargo, teniendo que la Proteasa N y la Alcalasa 0.6L, en 30 minutos de hidrólisis, lo mismo que y la Proteasa 2A en 90 minutos de hidrólisis, desarrollaron un sabor ligeramente amargo. La hidrólisis enzimática mejoró también las propiedades emulsificantes de la proteína.

Las condiciones óptimas de hidrólisis para obtener una emulsión estable fueron: Proteasa N en 30 minutos de hidrólisis, con un porcentaje de proteína soluble de 8.02 % y enzima Proteasa 2A en 90 minutos de hidrólisis, con un porcentaje de proteína soluble de 16.50 %, contra un porcentaje de proteína soluble del control de 2.07 %. Al modificar la estructura de la proteína se facilitó el rompimiento de los enlaces peptídicos, aumentando la solubilidad de esta.

Con respecto a la osmolaridad, se observó que con tiempos cortos la osmolaridad es mejor y más adecuada. La enzima Proteasa N resultó de una osmolaridad de 404.1 mOsm/ L en 30 minutos de hidrólisis, y la enzima Proteasa 2A con 439.0 mOsm/ L en 90 minutos de hidrólisis, comparando con el control que resultó de 393.2 mOsm/ L. El uso de maltodextrinas de D.E. 10 como sustituto parcial de sacarosa permitió disminuir la osmolaridad de la fórmula.

Se logró estabilizar la fórmula mediante una hidrólisis parcial de la proteína de caseína y un proceso de homogenización, permitió a su vez estabilizar la emulsión sin necesidad de recurrir al uso de gomas, y solo se empleó lecitina de soya que es un emulsificante permitido para alimentos infantiles. Al aumentar la solubilidad, se estabilizó la emulsión. Esto se observó comparando los resultados con el control.

Las dos pruebas aplicadas reflejaron facilitar la formación de la emulsión, principalmente por rebajar la tensión interfasial contribuyendo a estabilizar la emulsión al formar una barrera física en la interfase. La proteína juega un papel importante ya que después de la hidrólisis, resultó más flexible. Con el índice de actividad emulsificante, se pudo seleccionar a las emulsiones más estables, 54.77 g/m para la enzima Proteasa N en 30 minutos de hidrólisis y 60.57 g/m para la enzima Proteasa 2A en 90 minutos de hidrólisis, comparados contra un resultado de 38.29 g/m del control. Con la resistencia a la coalescencia no se observó aceite separado, porque la proteína empleada es muy eficiente (en los intervalos observados) para mantener una emulsión estable. Comparando ambos resultados con el control, se observó que las emulsiones son más estables cuando la proteína fue tratada enzimáticamente. Los resultados muestran que las mejores emulsiones son en tiempos cortos de hidrólisis indicando que con una hidrólisis limitada se logró estabilizar la fórmula.

Se obtuvo un tamaño de glóbulos (200-400 micras) similar a otras emulsiones alimenticias (mayonesas, aderezos, etc.) dentro de lo "normal", lo que permite una emulsión estable, comparando con el control donde el tamaño de glóbulos varió de 100 a 1000 micras.

BIBLIOGRAFIA

Adler Nissen J. 1986. Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier Applied Science Pub. London.

Adler Nissen J. 1976. Enzymatic hydrolysis of food proteins for increased solubility. J. Agric. Food Chem. Vol. 24 No. 6. pp 1090-1093.

AOAC (Association of Official Agricultural Chemistry). Official Methods of Analysis 1985. Published by AOAC, Inc. USA. 11 th. edition.

Appendini Albrechtsen P.I., Pérez Munguía S. 1993. Modificación enzimática de la proteína de pollo para la elaboración de una fórmula para niños desnutridos. Tesis Profesional, Facultad de Química. UNAM, México.

Badui D.S. 1989. Química de los alimentos. Alhambra, Méx. pp 376,384.

Berg Alan. 1978. Estudios sobre nutrición. Su importancia en el desarrollo socio-económico. Ed. Limusa, México.

Britten M., Giroux H.J., 1991. Coalescence index of protein-stabilized emulsions. Journal of Food Science. Vol. 56 No. 3: 792-795.

Brady Mary Sue, Rickard Kary A., Fitzgerald Joseph F. and Lemons James A. 1986. Specialized formulas and feedings for infants with malabsorption or formula intolerance. Journal of The American Dietetic association. Vol. 86 No. 2 pp 191-200.

Burgeois C.M. Leroux, 1986 Proteínas Animales, extractos, concentrados y aislados en la alimentación humana. El manual moderno pp 80-82.

Charalambous G. Doxastikis G. 1989. Developments in food Sci. Food emulsifiers chemistry. Technology, functional properties and applications. Elsevier Applied Science pub. B:V.:p 1-8, 114-132, 199-202.

Charley Helen. 1987. Procesos químicos y físicos en preparación de alimentos. Tecnología de Alimentos. Ed. Limusa. México. pp 355-369

Chávez A., Martínez C., Martínez H. 1990, Nutrición y comunidad. INN. México.

Chobert, Jean Marc, Sitohy, Mahmoud Z, and Whitaker John R. 1988. Solubility and emulsifying properties of casein modified enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 protease. J. Agric. Food Chem., Vol 36, No. 1: pp 220-224.

CODEX Alimentarius, 1981, Norma Para lactantes y niños. CAC. Vol. IX, Ed. 1

Dagorn-Scaviner C., Gueguen, J., and Lefebvre, J. 1987. Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorption Behaviors. Journal of Food Science. Vol. 52, No. 2, pp 335-341.

- FAO, 1970. Contenido de aminoácidos de los alimentos y datos biológicos sobre proteínas.
- Fennema. O.R. Food Chemistry 1985. Marcel Dekker Inc. 2a. Ed. pp 166-300
- Frenk S. 1989 "Adaptación metabólica en la desnutrición". Cuadernos de nutrición 12:17.
- Gacesa Peter and Hubble John. 1990. Tecnología de las enzimas. Ed. Acibia S.A., pp 89-91.
- Ganong William F. 1994. Manual de Fisiología Médica. El Manual Moderno. pp 427-443.
- García Garibay M., Quintero Ramirez R., López-Munguía C. A.. 1993. Biotechnología Alimentaria. Ed. Limusa, S.A de C.V. pp 103-123.
- Gómez F. 1946. "Desnutrición" Bol. Méd. Hospital Infantil (México) 3:543-551.
- Haining Zhu and Srinivasan Damodaran. 1994. Heat-Induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties. J. Agric. Food Chem. 42:846-855.
- Hans Dieter Belitz, Werner Grosch. 1988. Química de los alimentos. Ed. Acibia, S.A.. Zaragoza. pp 370-375.
- Hardwick Julie E. and Glatz Charles E. 1989. Enzymatic Hydrolysis of com Gluten meal. J. Agric. Food Chem. vol. 37 No. 4. pp 1188-1196.
- Hegarty J.E., Fairclough P.D., Moriarty K.J., Kelly M.J., Clark M.L. 1982. "Effects of concentration on in vivo absorption of a peptide containing protein hydrolysate". Gut. 23:304-309.
- Keith B. Taylor and Luean E. Anthony. Nutrición clínica. 1991. Ed. Mc Graw Hill. México.
- Lara P. 1990 Desarrollo de un alimento bajo en fenilalanina. Tesis de Maestría. Fac. de Química, UNAM, México.
- Lloyd M. Smith and Toshiko Dairiki. 1972. Stability of milk fat emulsions. II. Influence of emulsifier structure, sodium caseinate, and nonfat milk solids. Journal of Dairy Science vol. 58 No. 9. pp 1258-1262.
- Lowry D.H., Rosenbrough M.J. Fair A., Randall R.J. 1951. "Protein measurement with the Folin-phenol reagent" J. Biol. chem. 183:256.
- Mahmoud, Mohamed I, Malone William T., and Cordle Christopher T. 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. Journal of Food Science. Vol. 57, No. 5, pp 1223-1228.
- Mc Laren D.S. 1983. La nutrición y sus trastornos. El Manual moderno México, pp 115-125.
- Miller Mark J.S, Witherly Steven A., Clark David A. 1990. Casein: a milk protein with diverse biologic consequences. Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine, 195: 143.
- Nurko S. García Aranda J.A., Pérez Z.M., Arvizu M.S., Covarrubias M.M., Sishbein S.E.,

- Pearce Kevin N and Kinsella, John E. 1978. Emulsifying properties of proteins. Evaluation of a turbidimetric Technique. Journal Agric. Food Chem., Vol. 26, No. 3, pp 716-723
- Pelissier J.P. and Manchon P. 1976. Comparative study of the bitter taste of enzymic hydrolysates from cow, ewe and goat caseins. Journal of Food Science. vol. 41 pp 231-233
- Peterson Gary L. 1979. Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Analytical Biochemistry. 100:201-220
- Phillips R.D., Beuchat L.R. 1981. "Enzymatic modification of proteins". Protein functionality in foods. Symposium series 147. Am Chem. Soc. Washington, D.C. pp 275-295
- Ramos Galvan Rafael. 1995. Alimentación normal en niños y adolescentes. Ed. El manual moderno. S.A. de C.V., México, pp 72-83
- Ramos Galvan Rafael. 1973. Desnutrición y crecimiento físico. Nuevos aspectos sobre viejos conceptos de la desnutrición. México, pp 247-265
- Saterlee L.A., Chang K.C., 1984. Protein deterioration. Food Development. P. 50
- Schoen, Herbert M. 19. Functional properties of proteins and their measurement. Food proteins.
- Sepúlveda J. 1988. Enfermedades diarreicas en el niño. Ediciones médicas del Hospital infantil de México 9ª Ed. pp 313-315.
- Smith, D.M., Brekke C.J. 1985. "Enzymatic modification of the structure and functional properties of mechanically deboned fowl proteins" J. Agric. Food Chem. 33:631-637.
- Tussaint M.G., Gutierrez C.E. 1993. "A comparative study of three diets for the nutrition rehabilitation of severely mal nourished children". Gastroenterology. 104:A638
- Vega F.L., Yepes P.N., Sepúlveda H.M., Calva R.R. 1988. La dieta elemental en la recuperación inicial de la desnutrición grave. Gaceta Médica de México 124:99.
- Vega F.L., Carbajal G.A., García A. J. 1982. Alimentación enteral continua en niños lactantes empleando una dieta elemental. Bol. Med. Hospital infantil de México. 39: 651-658.
- Vegarud, G.E.; Langrud, T. The level of bitterness and solubility of hydrolysates produced by controlled proteolysis of caseins. 1989. Proceedings of the Hannah research Institute casein conference Dalglish, D.G. Home, D.S. vol. 56 No. 3 pp 375-379.
- Whitaker J.R. Tanenbaum S.R. 1977. Food Proteins AVI Publishing Co., Westport, Connecticut
- Wiseman Alan. 1991. Manual de biotecnología de los enzimas. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza, pp 59-60, y 269-287

APENDICE

TITLE 'PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION.'
SUBTITLE 'INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS'.

WARNING 111, Text: SUBTITLE
UNEXPECTED SYMBOL ON TITLE COMMAND--Something occurs after a closing
apostrophe and is ignored. Check for a missing command terminator.

DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 7-11.
FORMATS V3 (F5.2).
DISPLAY.

Page	2	PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION.	7/5/96
	V1	- * No label *	
	V2	- * No label *	
	V3	- * No label *	

VARIABLE LABELS V1 'CUATRO TIEMPOS'
V2 'REPETICIONES'
V3 'INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.'

VALUE LABELS V1 1 '0 MIN' 2 '30 MIN' 3 '90 MIN' 4 '150 MIN' /
V2 1 'R 1' 2 'R 2' 3 'R3' 4 'R4' 5 'R5' 6 'R6' 7 'R7' 8 'R8'
9 'R9' 10 'R10' 11 'R11' 12 'R12' 13 'R13' 14 'R14' 15 'R15'
16 'R16' 17 'R17' 18 'R18' /.

BEGIN DATA.
72 cases are written to the uncompressed active file.

This procedure was completed at 11:59:16
DISPLAY.

Page	3	PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION.	7/5/96
	V1	- CUATRO TIEMPOS	
	V2	- REPETICIONES	
	V3	- INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.	

LIST.

Page	4	PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION.	7/5/96
------	---	--	--------

V1 V2 V3

1	1	47.19
1	2	47.19
1	3	47.02
1	4	46.85
1	5	46.68
1	6	44.77
1	7	45.12
1	8	45.29
1	9	45.46
1	10	45.64
1	11	45.46
1	12	45.98
1	13	48.58
1	14	48.58
1	15	48.49
1	16	46.31

ESTRATÉGIA DE LA INVESTIGACIÓN
ESTRATÉGIA DE LA INVESTIGACIÓN

1 17 45.81
1 18 45.93
2 1 54.45
2 2 54.80

Page 5 PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION.

7/5/96

V1 V2 V3

2 3 54.98
2 4 53.94
2 5 54.11
2 6 54.02
2 7 54.98
2 8 54.89
2 9 54.80
2 10 55.24
2 11 54.98
2 12 55.24
2 13 54.63
2 14 54.63
2 15 55.15
2 16 54.98
2 17 54.89
2 18 55.15
3 1 56.53
3 2 56.53
3 3 56.70
3 4 59.81

Page 6 PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION.

7/5/96

V1 V2 V3

3 5 60.42
3 6 59.38
3 7 58.95
3 8 58.78
3 9 59.30
3 10 61.07
3 11 61.20
3 12 61.37
3 13 60.16
3 14 60.16
3 15 59.47
3 16 61.03
3 17 60.51
3 18 59.64
4 1 63.10
4 2 63.19
4 3 63.19
4 4 63.36
4 5 63.27
4 6 63.27

Page 7 PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION.

7/5/96

V1 V2 V3

4 7 63.10

4 8 63.36
 4 9 63.19
 4 10 65.78
 4 11 65.69
 4 12 65.61
 4 13 64.83
 4 14 64.92
 4 15 65.00
 4 16 63.97
 4 17 64.05
 4 18 64.83

Number of cases read = 72 Number of cases listed = 72

Page 8 PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION. 7/5/96

This procedure was completed at 11:59:18
 ONEWAY/VARIABLES V3 BY V1 (1,4)/STATISTICS ALL/RANGES DUNCAN (0.05)/
 RANGES DUNCAN (0.01).

Page 9 PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION. 7/5/96

----- O N E W A Y -----

Variable V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
 by Variable V1 CUATRO TIEMPOS

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	3059.4750	1019.8250	820.8526	.0000
Within Groups	68	84.4830	1.2424		
Total	71	3143.9580			

Page 10 PROTEASA N CONC. PROTEINA 3.0% REPETICION. 7/5/96

----- O N E W A Y -----

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	18	46.4678	1.1951	.2817	45.8735 To 47.0621
Grp 2	18	54.7700	.4034	.0951	54.5694 To 54.9706
Grp 3	18	59.4983	1.5393	.3628	58.7329 To 60.2638
Grp 4	18	64.0950	1.0045	.2368	63.5954 To 64.5946
Total	72	56.2078	6.6544	.7842	54.6441 To 57.7715
Fixed Effects Model		1.1146		.1314	55.9457 To 56.4699
Random Effects Model				3.7635	44.2307 To 68.1849
Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance					56.5879

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	44.7700	48.5800
Grp 2	53.9400	55.2400
Grp 3	56.5300	61.3700
Grp 4	63.1000	65.7800
Total	44.7700	65.7800

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variances) = .4768, P = .012 (Approx.)
 Bartlett-Box F = 8.072, P = .000
 Maximum Variance / Minimum Variance 14.562

----- O N E W A Y -----

Variable V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
 By Variable V1 CUATRO TIEMPOS

Multiple Range Test

Duncan Procedure

Ranges for the .050 level -

2.82 2.97 3.07

The ranges above are table ranges.

The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..
 .7882 * Range * Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

G G G G
 r r r r
 P P P P

Mean	Group	1	2	3	4
46.4678	Grp 1				
54.7700	Grp 2	*			
59.4983	Grp 3	*	*		
64.0950	Grp 4	*	*	*	

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

TITLE 'PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0%'.
SUBTITLE 'INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS'.
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 7-11.
FORMATS V3 (F5.2).
DISPLAY.

Page 80 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS
V1 - * No label *
V2 - * No label *
V3 - * No label *

VARIABLE LABELS V1 'CUATROS TIEMPOS'
V2 'REPETICIONES'
V3 'INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.'

VALUE LABELS V1 1 '0 MIN' 2 '10 MIN' 3 '90 MIN' 4 '150 MIN' /
V2 1 'R 1' 2 'R 2' 3 'R3' 4 'R4' 5 'R5' 6 'R6' 7 'R7' 8 'R8'
9 'R9' 10 'R10' 11 'R11' 12 'R12' 13 'R13' 14 'R14' 15 'R15'
16 'R16' 17 'R17' 18 'R18' /.

BEGIN DATA.
72 cases are written to the uncompressed active file.

This procedure was completed at 12:14:47
DISPLAY.

Page 81 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS
V1 - CUATROS TIEMPOS
V2 - REPETICIONES
V3 - INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.

LIST.

Page 82 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

V1 V2 V3

1 1 37.86
1 2 37.95
1 3 38.20
1 4 39.41
1 5 39.59
1 6 39.07
1 7 38.90
1 8 38.64
1 9 39.15
1 10 39.41
1 11 37.95
1 12 38.90
1 13 38.90
1 14 39.13
1 15 38.98
1 16 39.24
1 17 38.64

1 18 47.95
2 1 40.63

Page 83 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0%
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

7/5/96

V1 V2 V3

2 2 40.02
2 3 39.24
2 4 38.64
2 5 39.41
2 6 41.14
2 7 44.43
2 8 44.26
2 9 44.69
2 10 39.33
2 11 38.98
2 12 39.41
2 13 42.87
2 14 44.77
2 15 44.60
2 16 43.13
2 17 42.44
2 18 42.01
3 1 59.64
3 2 60.07

Page 84 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0%
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

7/5/96

V1 V2 V3

3 3 59.81
3 4 60.68
3 5 61.46
3 6 61.98
3 7 58.69
3 8 59.04
3 9 60.33
3 10 58.95
3 11 59.47
3 12 60.07
3 13 60.42
3 14 61.55
3 15 62.67
3 16 60.60
3 17 61.98
3 18 63.01
4 1 68.89
4 2 68.03
4 3 68.55

Page 85 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0%
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

7/5/96

V1 V2 V3

4 4 69.67
4 5 72.27

4 6 71.74
 4 7 73.22
 4 8 72.11
 4 9 72.53
 4 10 70.79
 4 11 70.45
 4 12 71.23
 4 13 70.79
 4 14 71.66
 4 15 70.71
 4 16 68.55
 4 17 70.28
 4 18 71.05

Number of cases read = 72 Number of cases listed = 72

 Page 86 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

This procedure was completed at 12:14:54
 ONEWAY/VARIABLES V3 BY V1 (1,4)/STATISTICS ALL/RANGES DUNCAN (0.05)/
 RANGES DUNCAN (0.01).

 Page 87 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

----- O N E W A Y -----

Variable V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
 By Variable V1 CUATROS TIEMPOS

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	12620.8526	4206.9509	1799.9205	.0000
Within Groups	68	158.9363	2.3373		
Total	71	12779.7889			

 Page 88 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

----- O N E W A Y -----

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	18	38.7817	.5717	.1348	38.4974 To 39.0660
Grp 2	18	41.6667	2.2754	.5363	40.5351 To 42.7982
Grp 3	18	60.5789	1.2796	.3016	59.9425 To 61.2152
Grp 4	18	70.6956	1.4857	.3502	69.9567 To 71.4344
Total	72	52.9307	13.4163	1.5811	49.7780 To 56.0834
Fixed Effects Model			1.5288	.1802	52.5712 To 53.2902

Random Effects Model 7.6439 28.6046 To 77.2568

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance 233.5896

Page 89 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	37.8600	39.5900
Grp 2	38.6400	44.7700
Grp 3	58.6900	63.0100
Grp 4	68.0300	73.2200
Total	37.8600	73.2200

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variances) = .5538, P = .001 (Approx.)
 Bartlett-Box F = 8.791, P = .000
 Maximum Variance / Minimum Variance 15.840

Page 90 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

----- O N E W A Y -----

Variable V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
 By Variable V1 CUATROS TIEMPOS

Multiple Range Test

Duncan Procedure
 Ranges for the .050 level -

2.82 2.97 3.07

The ranges above are table ranges.
 The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..
 $1.0810 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

(*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

Page 91 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

G G G G
 r r r r
 P P P P

Mean Group 1 2 3 4
 38.7817 Grp 1

G G G G
r r r r
P P P P

Mean	Group	1	2	3	4
38.7817	Grp 1				
41.6667	Grp 2	*			
60.5789	Grp 3	*	*		
70.6956	Grp 4	*	*	*	

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 1
Mean	38.7817

SUBSET 2

Group	Grp 2
Mean	41.6667

SUBSET 3

Group	Grp 3
Mean	60.5789

SUBSET 4

Group	Grp 4
Mean	70.6956

This procedure was completed at 12:15:05
ONEWAY/VARIABLES V3 BY V2 (1,18)/STATISTICS ALL.

----- O N E W A Y -----

Variable V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
By Variable V2 REPETICIONES

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	17	63.8798	3.7576	.0160	1.0000
Within Groups	54	12715.9090	235.4798		
Total	71	12779.7889			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int for Mean
Grp 1	4	51.7550	14.9735	7.4868	27.9291 To 75.5809

Page 98	PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0%				7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS					
Grp 2	4	51.5175	14.8557	7.4279	27.8791 To 75.1559
Grp 3	4	51.4500	15.1322	7.5661	27.3717 To 75.5283
Grp 4	4	52.1000	15.5406	7.7703	27.3718 To 76.8282
Grp 5	4	53.1825	16.4041	8.2021	27.0802 To 79.2848
Grp 6	4	53.4825	15.9750	7.9875	28.0631 To 78.9019
Grp 7	4	53.8100	15.3932	7.6966	29.3163 To 78.3037
Grp 8	4	53.5125	15.0911	7.5455	29.4996 To 77.5254
Grp 9	4	54.1750	15.1713	7.5857	30.0344 To 78.3156
Grp10	4	52.1200	15.4957	7.7478	27.4633 To 76.7767
Grp11	4	51.7125	15.9457	7.9728	26.3397 To 77.0853
Grp12	4	52.4025	15.9623	7.9812	27.0032 To 77.8018
Grp13	4	53.2450	14.9747	7.4874	29.4172 To 77.0728
Grp14	4	54.3275	14.9315	7.4658	30.5685 To 78.0865
Grp15	4	54.2400	14.9234	7.4617	30.4939 To 77.9861
Grp16	4	52.8800	13.9793	6.9896	30.6362 To 75.1238
Grp17	4	53.3350	15.2372	7.6186	29.0896 To 77.5804
Grp18	4	53.5050	16.0444	8.0222	27.9752 To 79.0348
Total	72	52.9307	13.4163	1.5811	49.7780 To 56.0834

Fixed Effects Model 15.3454 1.8085 49.3049 To 56.5565

Page 99 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

Random Effects Model 1.8085 49.1152 To 56.7462

WARNING - Between component variance is negative
it was replaced by 0.0 in computing above random effects measures

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance -57.9305

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	37.8600	68.8900
Grp 2	37.9500	68.0300
Grp 3	38.2000	68.5500

Grp 4	38.6400	69.6700
Grp 5	39.4100	72.2700
Grp 6	39.0700	71.7400
Grp 7	38.9000	73.2200
Grp 8	38.6400	72.1100
Grp 9	39.1500	72.5100
Grp10	39.3300	70.7900

Page 100	PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0%	7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS		
Grp11	37.9500	70.4500
Grp12	38.9000	71.2300
Grp13	38.9000	70.7900
Grp14	39.3300	71.6600
Grp15	38.9800	70.7100
Grp16	39.2400	68.5500
Grp17	38.6400	70.2800
Grp18	37.9500	71.0500
Total	37.8600	73.2200

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variances) = .0635, P = 1.000 (Approx.)
 Bartlett-Box F = .008, P = 1.000
 Maximum Variance / Minimum Variance 1.377

Page 101 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

This procedure was completed at 12:15:11
 ANOVA/ VARIABLES V3 BY V1 (1,4) V2 (1,18) /OPTIONS 3.

'ANOVA' PROBLEM REQUIRES 4880 BYTES OF MEMORY.

Page 102 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

*** ANALYSIS OF VARIANCE ***

V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
 BY V1 CUATROS TIEMPOS
 V2 REPETICIONES

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	12684.732	20	634.237	340.283	.000
V1	12620.853	3	4206.951	2257.128	.000
V2	63.880	17	3.758	2.016	.028
Explained	12684.732	20	634.237	340.283	.000
Residual	95.056	51	1.864		
Total	12779.789	71	179.997		

Page 103 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96

INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

72 Cases were processed.
0 CASES (.0 PCT) were missing.

Page 104 PROTEASA 2A CONC. PROTEINA 3.0%
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

7/5/96

This procedure was completed at 12:15:16
SET/PRINTER OFF.

TITLE 'ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0%'.
SUBTITLE 'INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS'.
DATA LIST FIXED /V1 1 V2 3-4 V3 7-11.
FORMATS V3 (F5.2).
DISPLAY.

Page 2 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS
V1 - * No label *
V2 - * No label *
V3 - * No label *

VARIABLE LABELS V1 'CUATRO TIEMPOS'
V2 'REPETICIONES'
V3 'INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.'

VALUE LABELS V1 1 '30 MIN' 2 '90 MIN' 3 '150 MIN' /
V2 1 'R 1' 2 'R 2' 3 'R3' 4 'R4' 5 'R5' 6 'R6'/.

BEGIN DATA.

72 cases are written to the uncompressed active file.

This procedure was completed at 13:36:29
DISPLAY.

Page 3 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS
V1 - CUATRO TIEMPOS
V2 - REPETICIONES
V3 - INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.

LIST.

Page 4 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

V1 V2 V3

1 1 41.12
1 2 40.07
1 3 42.01
1 4 38.44
1 5 38.12
1 6 37.82
1 7 38.60
1 8 38.48
1 9 38.42
1 10 36.88
1 11 37.34
1 12 36.64
1 13 35.96
1 14 36.13
1 15 38.46
1 16 38.20
1 17 38.20
1 18 38.68
2 1 38.42

Page 5 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0%
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

7/5/96

V1 V2 V3

2 2 38.48
2 3 37.81
2 4 38.82
2 5 38.66
2 6 38.86
2 7 38.96
2 8 36.90
2 9 36.85
2 10 42.01
2 11 41.64
2 12 41.80
2 13 38.89
2 14 37.64
2 15 36.92
2 16 36.86
2 17 36.83
2 18 36.80
3 1 37.34
3 2 37.86

Page 6 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0%
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

7/5/96

V1 V2 V3

3 3 37.17
3 4 38.20
3 5 38.38
3 6 38.12
3 7 42.30
3 8 43.04
3 9 42.87
3 10 38.72
3 11 38.03
3 12 38.98
3 13 42.53
3 14 42.27
3 15 42.01
3 16 43.31
3 17 43.31
3 18 43.56
4 1 50.39
4 2 50.65
4 3 50.82

Page 7 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0%
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

7/5/96

V1 V2 V3

4 4 50.39
4 5 50.74
4 6 50.31
4 7 54.63

4 8 54.45
 4 9 54.37
 4 10 54.20
 4 11 51.34
 4 12 51.17
 4 13 51.69
 4 14 52.99
 4 15 53.07
 4 16 51.69
 4 17 52.73
 4 18 52.73

Number of cases read = 72 Number of cases listed = 72

Page 8 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

This procedure was completed at 13:37:38
 ONEWAY/VARIABLES V3 BY V1 (1,4)/STATISTICS ALL/RANGES DUNCAN (0.05)/
 RANGES DUNCAN (0.01).

Page 9 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

----- O N E W A Y -----

Variable V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
 By Variable V1 CUATRO TIEMPOS

Analysis of Variance

Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	3	2346.9436	782.3145	223.6809	.0000
Within Groups	68	237.8272	3.4975		
Total	71	2584.7708			

Page 10 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

----- O N E W A Y -----

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int	for Mean
Grp 1	18	38.3094	1.5593	.3675	37.5340	To 39.0849
Grp 2	18	38.5083	1.7331	.4085	37.6465	To 39.3702
Grp 3	18	40.4444	2.4854	.5858	39.2085	To 41.6804
Grp 4	18	52.1311	1.5419	.3634	51.3643	To 52.8979
Total	72	42.3483	6.0337	.7111	40.9305	To 43.7662
Fixed Effects Model			1.8701	.2204	41.9085	To 42.7881
Random Effects Model				3.2963	31.8582	To 52.8384

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance 43.2676

Page 11 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	35.9600	42.0100
Grp 2	36.8000	42.0100
Grp 3	37.1700	43.5600
Grp 4	50.3100	54.6300
Total	35.9600	54.6300

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variances) = .4416, P = .036 (Approx.)
Bartlett-Box F = 1.842, P = .137
Maximum Variance / Minimum Variance 2.598

Page 12 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

----- O N E W A Y -----

Variable V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
By Variable V1 CUATRO TIEMPOS

Multiple Range Test

Duncan Procedure
Ranges for the .050 level -

2.82 2.97 3.07

The ranges above are table ranges.
The value actually compared with Mean(J)-Mean(I) is..
 $1.3224 * \text{Range} * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$

(*) Denotes pairs of groups significantly different at the .050 level

Page 13 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

		G G G C
		r r r r
		p p p p
Mean	Group	1 2 3 4
38.3094	Grp 1	
38.5083	Grp 2	
40.4444	Grp 3	* *

52.1311 Grp 4 * * *

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	38.3094	38.5083

Page 14 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

SUBSET 2

Group	Grp 3
Mean	40.4444

SUBSET 3

Group	Grp 4
Mean	52.1311

Page 15 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

----- O N E W A Y -----

Variable	V3	INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
By Variable	V1	CUATRO TIEMPOS

Multiple Range Test

Duncan Procedure
Ranges for the .010 level -

3.75 3.91 4.02

The ranges above are table ranges.
The value actually compared with $\text{Mean}(J) - \text{Mean}(I)$ is..
 $1.3224 * \text{Range} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

(*) Denotes pairs of groups significantly different at the .010 level

Page 16 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

G G G G
r r r r
P P P P

Mean	Group	1	2	3	4
38.3094	Grp 1				
38.5083	Grp 2				
40.4444	Grp 3		*	*	
52.1311	Grp 4		*	*	*

Homogeneous Subsets (Subsets of groups, whose highest and lowest means do not differ by more than the shortest significant range for a subset of that size)

SUBSET 1

Group	Grp 1	Grp 2
Mean	38.3094	38.5083

Page 17 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

SUBSET 2

Group	Grp 3
Mean	40.4444

SUBSET 3

Group	Grp 4
Mean	52.1311

Page 18 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

This procedure was completed at 13:38:41
ONEWAY/VARIABLES V3 BY V2 (1,18)/STATISTICS ALL.

Page 19 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

----- O N E W A Y -----

Variable V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE,
By Variable V2 REPETICIONES

Analysis of Variance					
Source	D.F.	Sum of Squares	Mean Squares	F Ratio	F Prob.
Between Groups	17	30.2987	1.7823	.0377	1.0000
Within Groups	54	2554.4721	47.3050		
Total	71	2584.7708			

Group	Count	Mean	Standard Deviation	Standard Error	95 Pct Conf Int	To	For Mean	
Grp 1	4	41.8175	5.9320	2.9660	32.3785	To	51.2565	

Page 20	ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0%						7/5/96	
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS								
Grp 2	4	41.7650	5.9960	2.9980	32.2241	To	51.3059	
Grp 3	4	41.9525	6.2894	3.1447	31.9449	To	51.9601	
Grp 4	4	41.4625	5.9571	2.9786	31.9835	To	50.9415	
Grp 5	4	41.4750	6.1806	3.0903	31.6404	To	51.3096	
Grp 6	4	41.2775	6.0375	3.0188	31.6706	To	50.8844	
Grp 7	4	43.6225	7.5250	3.7625	31.6487	To	55.5963	
Grp 8	4	43.2175	7.9279	3.9640	30.6026	To	55.8324	
Grp 9	4	43.1275	7.9168	3.9584	30.5303	To	55.7247	
Grp10	4	42.9525	7.7928	3.8964	30.5526	To	55.3524	
Grp11	4	42.0875	6.4501	3.2250	31.8241	To	52.3509	
Grp12	4	42.1475	6.3742	3.1871	32.0048	To	52.2902	
Grp13	4	42.2675	6.8324	3.4162	31.3958	To	53.1392	
Grp14	4	42.2575	7.6170	3.8085	30.1374	To	54.3776	
Grp15	4	42.6150	7.2886	3.6443	31.0174	To	54.2126	
Grp16	4	42.5150	6.7184	3.3592	31.8247	To	53.2053	
Grp17	4	42.7675	7.2033	3.6016	31.3056	To	54.2294	
Grp18	4	42.9425	7.1198	3.5599	31.6134	To	54.2716	
Total	72	42.3483	6.0337	.7111	40.9305	To	43.7662	
Fixed Effects Model			6.8779	.8106	40.7232	To	43.9734	

Page 21	ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0%						7/5/96	
INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS								
Random Effects Model				.8106	40.6382	To	44.0585	

WARNING - Between component variance is negative
it was replaced by 0.0 in computing above random effects measures

Random Effects Model - Estimate of Between Component Variance -11.3807

Group	Minimum	Maximum
Grp 1	37.3400	50.3900
Grp 2	37.8600	50.6500
Grp 3	37.1700	50.8200
Grp 4	38.2000	50.3900
Grp 5	38.1200	50.7400
Grp 6	37.8200	50.3100
Grp 7	38.6000	54.6300
Grp 8	36.9000	54.4500
Grp 9	36.8500	54.3700
Grp10	36.8800	54.2000

Group	Minimum	Maximum
Grp11	37.3400	51.3400
Grp12	36.6400	51.1700
Grp13	35.9600	51.6900
Grp14	36.1300	52.9900

Grp15	36.9200	53.0700
Grp16	36.8600	51.6900
Grp17	36.8300	52.7300
Grp18	36.8000	52.7300
Total	35.9600	54.6300

Tests for Homogeneity of Variances

Cochrans C = Max. Variance/Sum(Variations) = .0738, P = 1.000 (Approx.)
 Bartlett-Box F = .059, P = 1.000
 Maximum Variance / Minimum Variance 1.786

 Page 23 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

This procedure was completed at 13:39:04
 ANOVA/ VARIABLES V3 BY V1 (1,4) V2 (1,18) /OPTIONS 3.

'ANOVA' PROBLEM REQUIRES 4880 BYTES OF MEMORY.

 Page 24 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

*** ANALYSIS OF VARIANCE ***

BY V3 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE.
 V1 CUATRO TIEMPOS
 V2 REPETICIONES

Source of Variation	Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Signif of F
Main Effects	2377.242	20	118.862	29.210	.000
V1	2346.944	3	782.315	192.253	.000
V2	30.299	17	1.782	.438	.968
Explained	2377.242	20	118.862	29.210	.000
Residual	207.528	51	4.069		
Total	2584.771	71	36.405		

 Page 25 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS

72 Cases were processed.
 0 CASES (.0 PCT) were missing.

 Page 26 ALCALASA 0.6 L. CONC. PROTEINA 3.0% 7/5/96
 INDICE DE ACTIVIDAD EMULSIFICANTE A DIFERENTES TIEMPOS