

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL



“ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNA DE CLARA DE HUEVO”

INFORME DE SUFICIENCIA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO QUÍMICO

POR LA MODALIDAD DE ACTUALIZACIÓN DE CONOCIMIENTOS

PRESENTADO POR:

JULIO CÉSAR CARREÓN TORRES

**LIMA – PERÚ
2014**

INDICE

| | Página |
|--|--------|
| RESUMEN | 4 |
| I. INTRODUCCIÓN | 5 |
| II. MARCO TEÓRICO | 6 |
| 2.1. Propiedades, aplicaciones y proceso global | 6 |
| 2.1.1. Propiedades y aplicaciones de la clara de huevo | 6 |
| 2.1.2. Propiedades nutracéuticas y aplicaciones de la clara de huevo hidrolizada | 8 |
| 2.1.3. Proceso general para la obtención de clara hidrolizada de huevo en polvo | 11 |
| 2.1.3.1. Lavado | 11 |
| 2.1.3.2. Sanitización | 12 |
| 2.1.3.3. Rompimiento y separación | 12 |
| 2.1.3.4. Pasteurización | 13 |
| 2.1.3.5. Hidrólisis Enzimática | 15 |
| 2.1.3.6. Ultrafiltración | 15 |
| 2.1.3.7. Deshidratación | 16 |
| 2.2. Características y composición del huevo | 17 |
| 2.2.1. Tamaño, color y peso | 17 |
| 2.2.2. Estructura | 17 |
| 2.2.2.1. La cáscara | 18 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2.2. La yema | 20 |
| 2.2.2.3. La clara | 21 |
| 2.2.3. Composición del huevo de gallina | 21 |
| 2.3. Enzimas | 23 |
| 2.3.1. Fuentes de obtención de enzimas | 23 |
| 2.3.2. Propiedades químicas y físicas de las enzimas | 24 |
| 2.3.3. Clasificación de las enzimas | 25 |
| 2.3.4. Clasificación de las proteasas | 26 |
| 2.4. Hidrólisis enzimática | 26 |
| 2.4.1. Hidrólisis enzimática de proteínas | 27 |
| 2.4.2. Grado de Hidrólisis | 28 |
| 2.4.3. Etapas de la hidrólisis enzimática | 28 |
| 2.4.4. Variables de Control del proceso de hidrólisis enzimática | 30 |
| 2.5. Modelo Cinético de la hidrólisis enzimática de clara de huevo con pepsina | 31 |
| III. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEINA DE CLARA DE HUEVO | 35 |
| 3.1. Procedimiento general del experimento | 35 |
| 3.2. Técnica de medición de datos experimentales | 35 |
| 3.3. Datos experimentales | 37 |
| 3.3.1. Variación de temperatura | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.3.2. Variación de pH | 38 |
| 3.3.3. Variación de concentración de sustrato | 39 |
| 3.3.4. Variación de concentración de enzima | 40 |
| 3.4. Análisis de los datos experimentales que afectan al grado de hidrólisis | 41 |
| 3.4.1. Efecto de la temperatura | 41 |
| 3.4.2. Efecto del pH | 42 |
| 3.4.3. Efecto de la concentración del sustrato | 43 |
| 3.4.4. Efecto de la concentración de enzima | 44 |
| 3.4.5. Efectos de S_0 , e_0 y T sobre los parámetros a y b | 45 |
| 3.5. Determinación de las constantes cinéticas del mecanismo de hidrólisis enzimática y el mecanismo de desactivación enzimática | 47 |
| IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 53 |
| 4.1. Conclusiones | 53 |
| 4.2. Recomendaciones | 55 |
| V. BIBLIOGRAFIA | 56 |

RESUMEN

La hidrólisis enzimática es una tecnología novedosa, que está surgiendo cada vez más en el mundo con diversas aplicaciones cuyas principales son hidrólisis enzimática de celulosa, colágeno y clara de huevo. El presente informe describirá la tecnología de la hidrólisis enzimática aplicada a la clara de huevo.

En el segundo capítulo del informe se describirán las aplicaciones y beneficios en comparación a la clara de huevo sin hidrolizar, luego se describirán las operaciones unitarias que comprende el proceso de producción global, se describirá la química del huevo donde se identificarán sus componentes y propiedades tecnológicas y biológicas, se detallará la clasificación de las enzimas seguido de una descripción del proceso general de hidrólisis enzimática.

En la tercera sección del informe, se desarrollará el mecanismo cinético del proceso de hidrólisis enzimática de la clara de huevo, con la enzima pepsina donde se creará un modelo cinético que describa satisfactoriamente el comportamiento de la cinética química de dicho proceso; consecuentemente se ejecutará experimentalmente el proceso para analizar su comportamiento cinético y poder encontrar los valores de los parámetros del modelo cinético que cumplan con dicho comportamiento experimental.

En la cuarta parte del informe se indicarán las conclusiones y recomendaciones correspondientes al desarrollo del informe, en donde se indicarán las variables óptimas de operación y las características del proceso para recomendar el tipo de operación más adecuado.

I. INTRODUCCIÓN

La importancia de este informe tiene lugar en la industria alimenticia, donde por medio de la biotecnología, se pueden obtener proteínas simplificadas que pueden ser usadas tanto para la fabricación de premezclas alimenticias, teniendo mejores propiedades que las proteínas originales tales como menor viscosidad y mayor poder de disolución acuosa, así como para el consumo humano directo permitiendo disminuir el efecto alergénico y mejorar la digestión de la misma.

Uno de los países precursores de esta tecnología es España, cuya aplicación de la clara de huevo hidrolizada se destina a la gastronomía por su propiedad de gran estabilidad de espuma y gran propiedad organoléptica. Asimismo, se ha descubierto que los péptidos de dicha proteína tienen propiedades antihipertensivas. Dichos estudios fueron desarrollados por el Centro de Investigación de Alimentos (CSIC) y promovido por el Instituto de Estudios del Huevo de España.

En el Perú aún no se aplica dicha tecnología a la clara de huevo, sin embargo la mayor tendencia a los productos especializados implicará que en el futuro definitivamente se pueda aperturar dichos mercados orientados tanto a clientes industriales como al consumidor final.

Otras aplicaciones de la hidrólisis enzimática son la celulosa, la obtención del colágeno hidrolizado, lácteos hidrolizados y en general aplicación en macroproteínas que sean difíciles de digerir directamente o que requieran un procesamiento previo para su utilización como insumo industrial.

II. MARCO TEORICO

En esta sección se mencionarán las propiedades y aplicaciones de la clara de huevo en comparación con las propiedades y aplicaciones de la clara de huevo hidrolizada. Asimismo, se mencionarán las operaciones unitarias para el procesamiento de la clara de huevo y finalmente se darán a conocer los conceptos teóricos necesarios para el estudio del proceso de hidrólisis enzimática.

2.1. Propiedades, Aplicaciones y Proceso Global

En este punto se mencionan las principales propiedades correspondientes a la clara de huevo así como en su versión hidrolizada. El proceso de producción para la obtención de la clara de huevo hidrolizada sólo tiene como diferencia contra la obtención de la clara de huevo en polvo a las operaciones unitarias de hidrólisis enzimática y la de ultrafiltración.

2.1.1. Propiedades y aplicaciones de la clara de huevo

Las propiedades de una sustancia alimenticia se dividen en propiedades tecnológicas que son importantes para el procesamiento de alimentos y las propiedades biológicas las cuales indican el beneficio nutricional de dicho alimento. Cuando una propiedad biológica de un alimento tiene un valor agregado sobre la salud se refiere entonces a una propiedad nutracéutica.

Las principales propiedades tecnológicas de la clara de huevo son la capacidad espumante, la capacidad gelatinizante y la capacidad emulsificante.

Análogamente las propiedades biológicas de la clara de huevo son la capacidad antimicrobial, el poder inhibitorio de enzimas y la actividad alergénica.

Todas estas propiedades se deben principalmente a las proteínas presentes en la clara de huevo las cuales son ovoalbúmina (54%), ovotransferina (12-13%), ovomucoide (11%) y lisozima (3.5%)

Las funciones biológicas de la clara de huevo son:

- La prevención de la penetración de microorganismos hacia la yema y
- Provisión de nutrientes hacia el embrión durante las últimas etapas de su desarrollo

La mayoría de las proteínas de la clara del huevo son las que poseen las propiedades antimicrobiales, son solubles y fácilmente aislables. La clara de huevo contiene aproximadamente 40 tipos de proteínas diferentes las cuales poseen propiedades funcionales únicas tales como:

1. Propiedad antimicrobial
2. Propiedad enzimática
3. Propiedad inhibitoria
4. Propiedad de estimulación de crecimiento de células
5. Propiedad de unión metálica
6. Propiedad de unión de vitaminas
7. Propiedad de actividad inmunológica

Propiedades de Ovoalbúmina

La ovoalbúmina es la proteína predominante que contribuye a las propiedades funcionales de la clara. Su estructura química es fosfoglicoproteína monomérica con un peso molecular de 44.5 kDa y un punto isoelectrico de 4.5.

La ovoalbúmina es una proteína clave en Bioquímica. Actúa como transportador, estabilizador, agente de bloqueo. La ovoalbúmina altamente purificada ha sido objeto de estudios físicos y químicos como un conveniente modelo proteínico.

Propiedades de Ovotransferrina

También conocida como Conalbúmina ha sido identificada como la proteína transportadora del hierro desde la clara. Constituye 12% en peso de las proteínas de la clara y con un peso molecular de 77.7 kDa y un punto isoelectrico de 6.1.

La ovotransferrina puede ser usada como un ingrediente funcional en productos fortificados con hierro tales como suplementos de hierro, mezclas fortificadas con hierro para bebidas instantáneas, barras deportivas y suplementos proteínicos.

Propiedades de Ovomucoide

El Ovomucoide es una glicoproteína con actividad inhibidora de tripsina y estable al calor. Constituye el 11% en peso de las proteínas de la clara, tiene un peso molecular aproximado de 28 kDa y un punto isoelectrico de 4.1.

El ovomucoide puede ser calentado a 100°C bajo condiciones ácidas por largos periodos de tiempo sin ningún cambio aparente en sus propiedades físicas o químicas. Juega un rol importante en el desarrollo de las reacciones alérgicas a la clara de huevo a comparación de las otras proteínas de la clara.

Propiedades de Lisozima

Es una enzima bacteriolítica comúnmente encontrada en la naturaleza y está presente en casi todas las secreciones de fluidos corporales humanos y animales. También ha sido aislada de diferentes plantas y bacterias. La clara es una fuente rica y fácilmente disponible de Lisozima.

La Lisozima demuestra actividad antimicrobial contra un espectro limitado de bacterias y hongos. Sin embargo su actividad antibacterial es muy buena para ciertas bacterias Gram positivas. Por el otro lado las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a la acción bacteriolítica de la enzima.

2.1.2. Propiedades nutraceuticas y aplicaciones de la clara de huevo hidrolizada

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y por tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción.

El grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su posible uso. El grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original.

Los hidrolizados se utilizan ampliamente en la industria alimentaria por sus propiedades tecnológicas y biológicas.

Propiedades biológicas

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de alimentos enterales o alimentos especiales para suministrarse vía sonda directamente al estómago o al intestino. Estos alimentos se formulan a base proteínas (hidrolizadas), carbohidratos (azúcar), grasas, vitaminas y minerales dando como resultado un alimento en forma líquida listo para suministrarse y digerirse fácilmente.

Las características que cumplen las proteínas hidrolizadas para aplicación en nutrición enteral son: no producir desequilibrios osmóticos, no producir alergias, presentar un alto valor nutritivo no muy inferior al de la proteína de partida y tener un sabor aceptable.

Los hidrolizados que se producen para uso en alimentación se pueden agrupar en:

8. Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis (entre 1 y 10%) para la mejora de propiedades funcionales.
9. Hidrolizados con grado de hidrólisis variable para uso como saborizantes
10. Hidrolizados extensivos (con grado de hidrólisis superior a 10%) para uso en alimentación especializada.

Se reportó que la hidrólisis enzimática de clara de huevo con pepsina resulta en la producción de diferentes péptidos con las siguientes propiedades biológicas:

11. Antihipertensividad
12. Antimicrobial

13. Antioxidante

14. Quelante iónico

Propiedades tecnológicas:

Solubilidad:

En el punto isoeléctrico de la proteína, la solubilidad generalmente aumenta con la hidrólisis, ya que es principalmente el resultado de la reducción en peso molecular y del aumento en el número de grupos polares. El efecto de la hidrólisis sobre la solubilidad a otros valores de pH depende de la proteína estudiada.

Sabor amargo:

Un efecto secundario negativo importante de la hidrólisis de la proteína es la liberación de los péptidos generalmente con sabor más amargo que la proteína nativa. Se ha demostrado que el sabor amargo de los péptidos puros, a pesar de depender de la fuente de proteína y especificidad de la enzima, está relacionado con la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidrolizado.

Se han propuesto diversos métodos analíticos para predecir el sabor amargo de los hidrolizados. Adler-Nissen postula el aislamiento de péptidos hidrofóbicos extraídos con butanol en los que a través de la determinación de la hidrofobicidad y del peso molecular medio de estos péptidos, podría predecirse el grado de sabor amargo.

Emulsificación y espuma:

Las características de la emulsión y de formación de espuma de la proteína y de los hidrolizados de la proteína dependen del pH del sistema y de la enzima empleada para la hidrólisis. La formación y estabilidad de la espuma y las emulsiones deben medirse por separado.

Dentro de las técnicas de medición se encuentran la determinación del índice de actividad de emulsión (EAI) que mide la turbiedad de las emulsiones con cierta

fracción de aceite, mientras que la capacidad de emulsión (EC) determina la cantidad de aceite que se puede dispersar por cierta cantidad de proteína o hidrolizado. Aunque ambos métodos se utilizan para cuantificar la capacidad de formación de emulsión y formación de espuma de los hidrolizados, no miden realmente las mismas características.

2.1.3. Proceso general para la obtención de proteína hidrolizada de huevo en polvo

Se tienen diferentes operaciones unitarias partiendo del huevo entero hasta la obtención de albúmina hidrolizada de huevo en polvo.

2.1.3.1. Lavado

Los huevos enteros pasan por una máquina lavadora especial a operación continua. El agua de lavado debe reunir las siguientes características:

- La temperatura del agua de lavado debe tener una temperatura promedio de 32°C o por lo menos 11°C por encima de la temperatura del huevo.
- Los componentes limpiadores del agua de lavado deben ser aptos para limpieza de alimentos.

El agua de lavado continuo debe ser cambiado a lo mucho cada 4 horas o con mayor frecuencia para mantener las condiciones sanitarias requeridas.

El agua de enjuague (agua fresca) debe contener preferiblemente una concentración de cloruro y mantener un flujo continuo.

En la figura N° 2.1 se muestra una máquina lavadora de huevo.



Fig. N° 2.1. Máquina lavadora de huevos (Fuente: Diamond Automations Inc.)

2.1.3.2. Sanitización

Luego del lavado, el huevo no debe volver a remojar. Los huevos son sanitizados mediante rociado de agua con una concentración de cloro entre 100 y 200 ppm. Se debe tener en cuenta que antes de pasar a la siguiente operación unitaria (rompimiento y separación) el huevo debe estar seco para que el agua libre de la cáscara contamine el interior del huevo.

2.1.3.3. Rompimiento y separación.

Las máquinas de rotura y separación de huevos pueden procesar hasta 144,000 huevos/hora. La figura N° 2.2 muestra la operación de rompimiento y separación del huevo.

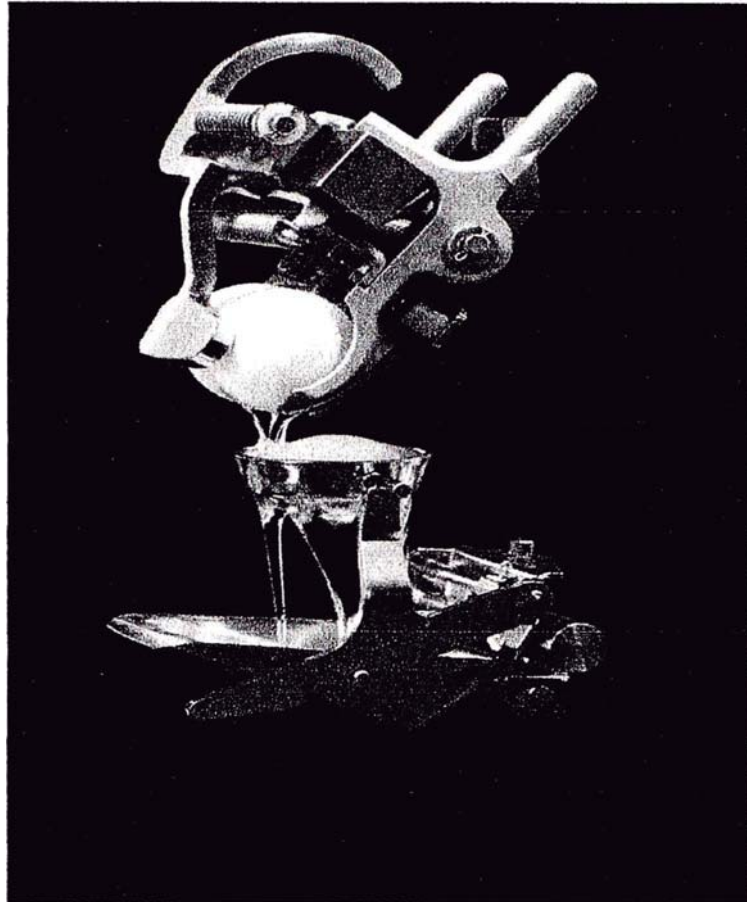


Fig. N° 2.2: Rompimiento y separación de una máquina automática rompedora de huevos. (Fuente: Diamond Automations Inc.)

Estas máquinas han mejorado las condiciones sanitarias y de operación haciéndolas muy eficientes. Generalmente esta operación tiene un límite máximo de contaminación de 0.05% de yema en la clara después del proceso de separación. Este equipo debe limpiarse y sanitizarse cada 4 horas o con mayor frecuencia.

2.1.3.4. Pasteurización

Es un proceso que consiste en ejercer sobre la clara cruda y natural un choque de temperatura para con ello ofrecer un producto fresco pero que cumpla con ciertos requisitos microbiológicos como la ausencia de salmonella.

Es imprescindible que la clara de huevo no se desnaturalice durante el proceso de pasteurización, es por ello que las temperaturas de la clara de huevo no alcancen los 60°C. En la tabla N° 2.1 se muestran las condiciones de operación para el proceso de pasteurización de diferentes productos de huevo determinadas por la USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos).

Tabla N° 2.1: Requerimientos de pasteurización por la USDA

| Ovoproductos líquidos | Temperatura mínima requerida (°C) | Tiempo de retención mínimo requerido (min) |
|--|-----------------------------------|--|
| Albumen sin químicos | 56.7 | 3.5-6.2 |
| Huevo entero | 60.0 | 3.5 |
| Huevo entero con aditivos (<2% aditivos) | 61.1 | 3.5-6.2 |
| Huevo entero con aditivos y fortificado (24-36% sólidos, 2-12% aditivos) | 62.2 | 3.5-6.2 |
| Huevo entero salado (adición >2% o más de sal) | 63.3 | 3.5-6.2 |
| Huevo entero azucarado (adición de 2-12% de azúcar) | 61.1 | 3.5-6.2 |
| Yema simple | 61.1 | 3.5-6.2 |
| Yema azucarada (adición de 2% o más de azúcar) | 63.3 | 3.5-6.2 |
| Yema salada (adición de 2-12% de sal) | 63.3 | 3.5-6.2 |

Fuente: USDA (1980)

La técnica de pasteurización más usada para el procesamiento de huevos es mediante el pasteurizador tubular que consiste en un sistema de pasteurización

HTST (Alta Temperatura en Corto Tiempo) mediante intercambiadores de calor de tipo tubular. En la figura N° 2.3 se puede ver el sistema de pasteurización tubular.

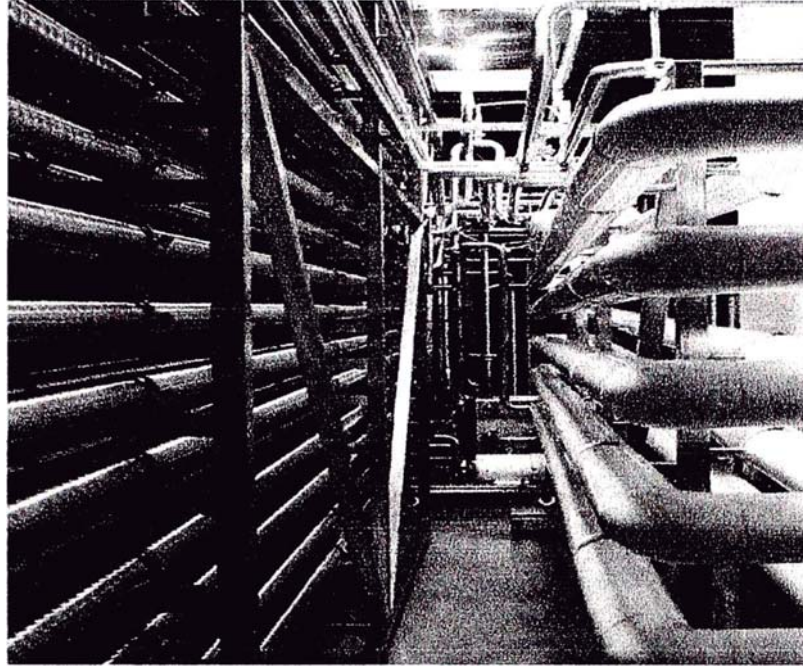


Fig. N° 2.3: Sistema de pasteurización tubular (3175 kg/h) (Fuente: Diamond Automation Inc.)

2.1.3.5. Hidrólisis Enzimática

El proceso de hidrólisis enzimática de la clara de huevo se realiza en un tanque reactor bajo condiciones específicas de operación tales como temperatura a 37°C, presión atmosférica, pH de 2 a 3 en una solución tampón con HCL 1 N, relación enzima/sustrato 1/100 partes en peso y durante un período de tiempo entre 10 min y como máximo hasta 24 h seguido de la inactivación de la pepsina elevando el pH a 7 con NaOH 1 N.

2.1.3.6. Ultrafiltración

Este proceso logra separar los péptidos de clara de huevo (producto deseado) del resto de albúmina no fragmentada, para ello se pasa el fluido por tubos a presión a

través de una membrana hidrofílica de 3000 Da. En la figura N° 2.4 se muestra el esquema típico de una membrana de ultrafiltración.

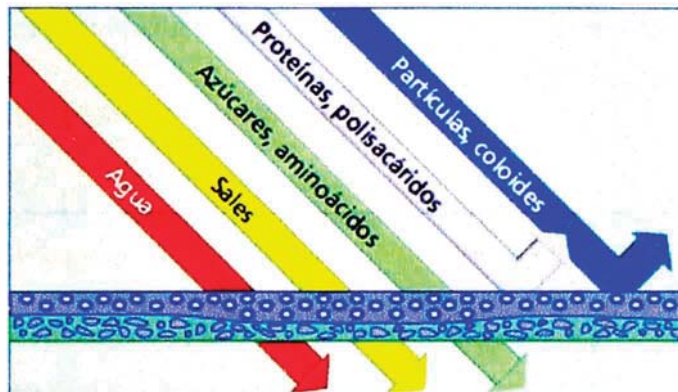


Figura N° 2.4: Esquema de ultrafiltración a través de una membrana semi permeable (Fuente: GEA Filtration)

2.1.3.7. Deshidratación

En la mayoría de casos, los huevos son deshidratados mediante atomizadores con una entrada de aire caliente entre 121 y 232 °C. El atomizado es logrado mediante la pulverización con boquillas de alta presión (500 – 6000 psi) junto con una corriente de aire caliente que evapora el agua casi instantáneamente. En la figura N° 2.5 se puede ver la boquilla a alta presión de un secador.

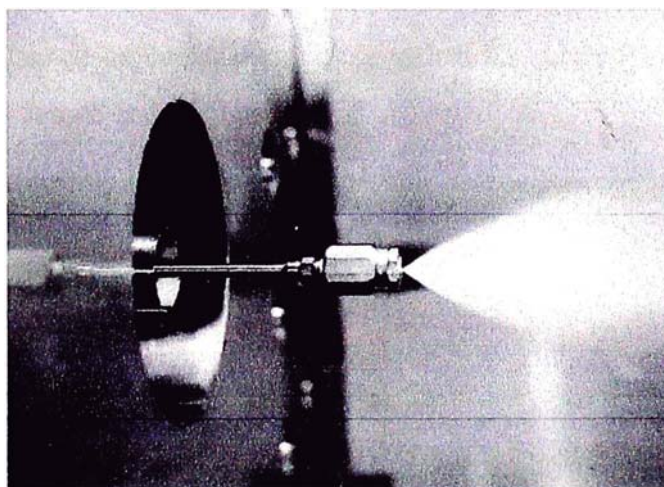


Figura N° 2.5: Boquilla para el atomizado a alta presión (Fuente: Sanovo Engineering)

Generalmente se prefiere el calentamiento indirecto del aire mediante serpentines de vapor para prevenir la disminución del sabor o formación de óxidos nítricos que pueden formarse mediante el uso directo con gas natural o propano.

El albumen en polvo se separa desde la cámara de secado y el aire es removido mediante un ventilador de escape.

Después del secado, el polvo es enfriado y tamizado antes del envasado.

2.2. Características y composición del huevo

2.2.1. Tamaño, color y peso

Los huevos de gallina pueden ser de variados tamaños; siendo muy pequeños en aves jóvenes y grandes en aves adultas. La diferencia radica que al ser más grandes, la cáscara es más frágil y propensa a romper. La cáscara de huevo se compone mayormente de carbonato de calcio. Pueden ser de color blanco o castaño claro según la especie de la gallina ponedora. El color de la cáscara no afecta su calidad, sabor, características al cocinar, valor nutricional o grosor de la misma.

2.2.2. Estructura

El corte transversal de un huevo permite identificar las partes fundamentales de su estructura como vemos en la figura N° 2.6:

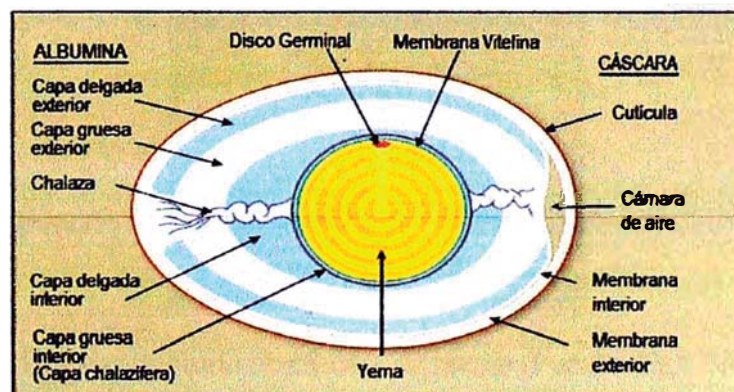


Fig. N° 2.6: Corte esquemático de un huevo (Fuente: The Science of Egg Quality)

El huevo se puede dividir en tres secciones principales secciones: la cáscara, la clara y la yema. Estas partes están separadas entre sí por medio de membranas que mantienen su integridad. El peso promedio de un huevo está en torno a los 60 gramos. En la tabla N° 2.2 se muestra la proporción en peso de la estructura del huevo cuyos valores dependen del tipo, la raza y alimentación del ave.

Tabla N° 2.2: Proporción en peso de la estructura del huevo

| Huevo entero | % peso |
|--------------|--------|
| Cáscara | 10% |
| Yema | 30% |
| Clara | 60% |

Fuente: El Libro del huevo. Instituto de estudios del huevo

2.2.2.1. La cáscara

La cáscara es la cubierta exterior del huevo y tiene gran importancia ya que mantiene la integridad física y actúa como barrera bacteriológica. En la figura N° 2.7 se puede identificar las partes que conforman la cáscara de huevo.



Fig. N° 2.7: Corte estructural de cáscara de huevo (Fuente: Egg Bioscience and Biotechnology)

Desde la parte interior de la cáscara hasta la parte externa se identifican seis tipos de capas:

1. Membrana interna: comprende aproximadamente 20 μm de espesor y está en contacto directo con la albúmina.
2. Membrana externa: comprende aproximadamente 50 μm de espesor y está localizada entre la membrana interna y la parte calcificada de la cáscara.

Las membranas están constituidas de fibras orgánicas entrelazadas entre sí formando capas paralelas a la superficie del huevo. Su importancia radica en que actúan como barrera en contra de la penetración de microorganismos.

3. Capa calcificada interna (capa mamilar o capa cónica): mide aproximadamente 70 μm de espesor y está compuesto de columnas y conos calcificados que se insertan en la membrana exterior de la cáscara. Cristales de carbonato de calcio están orientados al azar dentro de cada matriz mamilar para formar conos cementados entre sí y para formar una masa cohesiva concentrada de estos cristales.
4. Matriz fibrosa: contiene fibras finas de cristales de calcio (0.04 μm de diámetro) que se ordenan paralelamente entre sí formando una capa empalizada donde contiene también cristales de carbonato de calcio y está alineada en forma perpendicular a la superficie externa. Esta capa de aproximadamente 200 μm de espesor representa las dos terceras partes del espesor total de la cáscara.
5. Poros: Los poros son formados cuando las columnas adyacentes empalizadas presentan espacios intersticiales. Estos poros son importantes para permitir el intercambio de gas entre los extremos exterior e interior.
6. Cutícula: Es la capa más externa de la cáscara y mide aproximadamente 10 μm de espesor. Contiene la mayoría de los pigmentos de la cáscara y también una pequeña capa de cristales de hidroxiapatita en su parte interior que tapa los poros previniendo la penetración microbiana.

2.2.2.2. La yema

La yema viene a aportar la tercera parte del peso total del huevo y su función biológica es la de aportar nutrientes vitales (proteínas, lípidos, nutrientes y minerales) que serán extremadamente bien metabolizados por el embrión que crecerá en su interior. El color amarillo de la yema no proviene del beta-caroteno (color naranja de algunas verduras) sino de las xantófilas que la gallina obtiene de la alfalfa y de los diversos granos como el maíz.

La yema es también una fuente muy atractiva de nutrientes para humanos. Su coeficiente de uso digestivo es comparable a la leche y el valor biológico de las proteínas del huevo incluso es superior al de las proteínas de la leche.

La yema constituye un ingrediente multifuncional ampliamente usado en muchos productos alimenticios tales como mayonesa, vinagreta, queques, pastas, cremas, entre otros. Las condiciones del medio (pH, fuerza iónica) y los procesos de preservación (calentamiento, congelamiento, secado) pueden influenciar y modificar sus propiedades funcionales.

La tabla N° 2.3 muestra la composición general de la yema fresca y yema deshidratada.

Tabla N° 2.3: Composición de la yema

| | Yema fresca (%) | Yema deshidratada (%) |
|---------------|-----------------|-----------------------|
| Agua | 51.1 | - |
| Lípidos | 3.6 | 62.5 |
| Proteínas | 16.0 | 33.0 |
| Carbohidratos | 0.6 | 1.2 |
| Minerales | 1.7 | 3.5 |

Fuente: Powrie y Nakai (1986)

2.2.2.3. La clara

La clara aporta las dos terceras partes del peso total del huevo, se puede decir que es una textura cuasi-transparente que en su composición casi el 90% se trata de agua, el resto es proteína, trazas de minerales, materiales grasos, vitaminas (la riboflavina es la que proporciona ese color ligeramente amarillento) y glucosa (la glucosa es la responsable de oscurecer el huevo en las conservaciones de larga duración: ejemplo huevo centenario).

Las proteínas de la clara están presentes para defender al huevo de la infección de bacterias y otros microorganismos, su función biológica es la de detener agresiones bioquímicas del exterior.

Las proteínas incluidas en la clara de huevo son:

- La ovomucina que hace el 2% de la albúmina proteínica existente en el huevo, a pesar de ello es el ingrediente que mayores propiedades culinarias tiene debido a que es la responsable de cuajar el huevo frito y pochado. Su misión biológica es la de ralentizar la penetración de los microbios.
- La ovoalbúmina es la más abundante del huevo (54%) y es la proteína que primero se cristalizó en laboratorio, en el año 1890. Se desnaturaliza fácilmente con el calor.
- La conalbúmina que hace el 14% del total de las proteínas de la clara de huevo.
- El ovomucoide que alcanza una proporción del 2%

2.2.3. Composición del huevo de gallina

En la tabla N° 2.4 se muestra la composición típica de sustancias que componen el huevo de gallina por cada 100 g de porción comestible.

Tabla N° 2.4: Composición típica del huevo de gallina

| Composición | Unidad de medida | Huevo | Yema | Clara |
|----------------------|------------------|-------|------|-------|
| Agua | g | 74.5 | 51.7 | 88 |
| Energía | kcal | 162 | 353 | 49.1 |
| Proteínas | g | 12.7 | 16.1 | 11.1 |
| Carbohidratos | g | 0.68 | 0.3 | 0.7 |
| Azúcares | g | 0.68 | 0.3 | 0.7 |
| Lípidos | g | 12.1 | 31.9 | 0.2 |
| AGS | g | 3.3 | 9.5 | - |
| AGM | g | 4.9 | 13 | - |
| AGP | g | 1.8 | 5.5 | - |
| Colesterol | mg | 410 | 1260 | 0 |
| C18:1 Ác. Oléico | g | 4.4 | 11.7 | - |
| C18:2 Ác. Linoléico | g | 1.6 | 4.8 | - |
| C18:3 Ác. Linolénico | g | 0.098 | 0.26 | - |
| Tiamina | mg | 0.11 | 0.29 | 0.022 |
| Riboflavina | mg | 0.37 | 0.4 | 0.32 |
| Eq. de niacina | mg | 3.3 | 4.2 | 3.4 |
| Vitamina B6 | mg | 0.12 | 0.3 | 0.012 |
| Eq. Folato dietético | µg | 51.2 | 159 | 9.2 |
| Vitamina B12 | µg | 2.1 | 2 | 0.1 |
| Vitamina C | mg | 0 | 0 | 0.3 |
| Pantoténico | mg | 1.8 | 3.7 | 0.14 |
| Vitamina A | µg | 227 | 886 | 0 |
| Retinol | µg | 225 | 881 | 0 |
| Carotenoides | µg | 10 | 29 | 0 |
| Vitamina D | µg | 1.8 | 5.6 | 0 |
| Vitamina E | µg | 1.9 | 5.5 | 0 |
| Vitamina K | µg | 8.9 | 2 | 0.01 |
| Calcio | mg | 56.2 | 140 | 11 |
| Fósforo | mg | 216 | 592 | 21 |
| Hierro | mg | 2.2 | 7.2 | 0.2 |
| Yodo | µg | 12.7 | 12 | 6.8 |
| Zinc | mg | 2 | 3.8 | 0.02 |
| Magnesio | mg | 12.1 | 16 | 12 |
| Sodio | mg | 144 | 51 | 170 |
| Potasio | mg | 147 | 138 | 154 |
| Manganeso | mg | 0.041 | 0.13 | 0.04 |
| Cobre | mg | 0.065 | 0.35 | 0.006 |
| Selenio | µg | 10 | 19 | 5.4 |

Fuente: Tablas de composición de alimentos españoles. Ministerio de Sanidad y Consumo de España

2.3. Enzimas

Las enzimas se encuentran en todos los seres vivos y son piezas esenciales en su funcionamiento. Desde el punto de vista bioquímico son proteínas que actúan como aceleradores de las reacciones químicas, de síntesis y degradación de compuestos. Una de las características más sobresalientes de las enzimas es su elevada especificidad. Esto quiere decir que cada tipo de enzima se une a un único tipo de sustancia, el sustrato, sobre el que actúa.

Las enzimas tienen muchas aplicaciones en diversos tipos de industrias, entre las que se destaca la alimenticia. En algunos casos, como la obtención de yogurt, la cerveza o el vino, el proceso de fermentación se debe a las enzimas presentes en los microorganismos que intervienen en el proceso de producción. Sin embargo, otros procesos de producción de alimentos, pueden realizarse mediante la acción de las enzimas aisladas, sin incluir a los microorganismos que las producen.

Desde hace unas décadas se dispone de enzimas relativamente puras extraídas industrialmente de bacterias y hongos, y algunas de ellas de las plantas y los animales y con una gran variedad de actividades para ser utilizadas en la elaboración de alimentos.

Actualmente, la ingeniería genética contribuye a la biosíntesis de enzimas recombinantes de gran pureza, que aportan mayor calidad al producto final, y optimizan los procesos de producción de alimentos. Los progresos que se están realizando actualmente en esta área permiten augurar el desarrollo cada vez mayor del uso de enzimas en la industria alimenticia.

2.3.1. Fuentes de obtención de las enzimas

Las fuentes principales de enzimas para empleo industrial son:

- **Animales:** La industria empacadora de carnes es la fuente principal de las enzimas derivada del páncreas, estómago e hígado de los animales, tales como la tripsina, lipasas y cuajos (quimosina y renina).

- **Vegetales:** La industria de la malta de cebada es la fuente principal de enzimas de cereales. Las enzimas proteolíticas (que degradan proteínas) tales como la papaína y la bromelina se obtienen de la papaya y del ananá, respectivamente.
- **Microbianas:** principalmente se extraen de bacterias, hongos y levaduras que se desarrollan en la industria de la fermentación.

La ventaja de la obtención de enzimas microbianas es que los microorganismos se reproducen a ritmo acelerado, son fáciles de manipular genéticamente, crecen en un amplio rango de condiciones ambientales y tienen una gran variedad de vías metabólicas, haciendo que las enzimas obtenidas sean más económicas.

2.3.2. Propiedades químicas y físicas de las enzimas

Como las enzimas son proteínas combinadas con otros grupos químicos, poseen las mismas propiedades y características de las proteínas: se desnaturalizan con el calor, precipitan con el etanol o concentraciones elevadas de sales inorgánicas como el sulfato de amonio y no dializan a través de membranas semipermeables.

Algunas enzimas no requieren para su actividad más grupos químicos que residuos de aminoácidos; otros requieren un componente químico adicional (que se necesita de su adición para activar su función enzimática) llamado cofactor el cual puede ser uno o varios iones inorgánicos tales como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} ; o un complejo orgánico o metalo-orgánico denominado coenzima (generalmente el complejo de la vitamina B).

Algunas enzimas requieren tanto una coenzima como uno o más iones metálicos unidos covalentemente a la proteína enzimática, este se denomina grupo prostético. Una enzima complejo catalíticamente activo junto con su coenzima y/o iones metálicos se denomina holoenzima. La parte proteica de tal enzima se denomina apoenzima o apoproteína.

2.3.3. Clasificación de las enzimas

Muchas enzimas se han nombrado añadiendo el subfijo “asa” al nombre del sustrato o a una palabra que describe su actividad. Así la ureasa cataliza la hidrólisis de la urea y la DNA polimerasa cataliza la síntesis de DNA. Otras enzimas, tales como la pepsina y la tripsina tienen nombres que no se refieren a sus sustratos. A veces la enzima tiene dos o más nombres, o dos enzimas diferentes tienen el mismo nombre.

Debido a tales ambigüedades y al número siempre creciente de enzimas descubiertas, se ha adoptado por acuerdo de la Unión internacional de Bioquímica un sistema de nomenclatura y clasificación de enzimas. En la tabla N° 2.5 se muestra dicho sistema de nomenclatura en la que se distribuye las enzimas en seis clases principales, cada una de ellas con diferentes subclases, según el tipo de reacción catalizada

Tabla N° 2.5: Clasificación Internacional de Enzimas

| N° | Clase | Tipo de reacción catalizada |
|----|-----------------|--|
| 1 | Oxidoreductasas | Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H) |
| 2 | Transferasas | Reacciones de transferencia de grupos |
| 3 | Hidrolasas | Reacción de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua) |
| 4 | Liasas | Adición de grupos a dobles enlaces. Formación de dobles enlaces por eliminación de grupos |
| 5 | Isomerasas | Transferencia de grupos dentro de la molécula dando formas isoméricas |
| 6 | Ligasas | Formación de enlaces C-C, C-S, C-O y C-N; mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP |

Lehninger, 1993

2.3.4. Clasificación de las proteasas

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de Hidrolasas (Tabla N° 2.5), ya que catalizan la degradación de otras proteínas hidrolizando los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua.

Dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan las proteasas, estas se clasifican en:

- a) **Endopeptidasas:** son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína dando como resultado cadenas de péptidos (tripsina y quimotripsina).
- b) **Exopeptidasas:** actúan sobre enlaces terminales de una proteína basándose en su sitio de acción sobre el Nitrógeno o el Carbono terminal (aminopeptidasa y carboxipeptidasas).
- c) **Aminopeptidasas:** actúan sobre el Nitrógeno libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido o un dipéptido o tripéptido.
- d) **Carboxipeptidasas** actúan sobre el Carbono terminal de la cadena polipeptídica. Se subdividen en cuatro subgrupos dependiendo de su mecanismo catalítico y al grupo funcional presente en su sitio activo.

2.4. Hidrólisis enzimática

En los hidrolizados de proteína se potencian diversas características funcionales, tales como viscosidad baja, mayor capacidad de agitación, dispersión y alta solubilidad, que les conceden ventajas para el uso en muchos productos alimenticios, respecto a las proteínas originales.

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales o

entéricas con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos. Las dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición, con cuadros alergénicos en la mayoría de los casos.

Las características que deben cumplir estos hidrolizados de proteínas para formar parte de una dieta enteral son: no producir desequilibrios osmóticos ni alergias, presentar un alto valor nutritivo, no muy inferior al de la proteína de partida y tener un sabor aceptable.

Los hidrolizados que se producen para su uso en alimentación se pueden agrupar en:

- Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1% y el 10%, para la mejora de las propiedades funcionales.
- Hidrolizados con grados de hidrólisis variable para su uso como saborizantes.
- Hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada.

2.4.1. Hidrólisis enzimática de proteínas

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve o resuspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabilizan; a continuación se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En los casos de hidrólisis enzimática el pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida.

Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. O también

puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada.

2.4.2. Grado de Hidrólisis

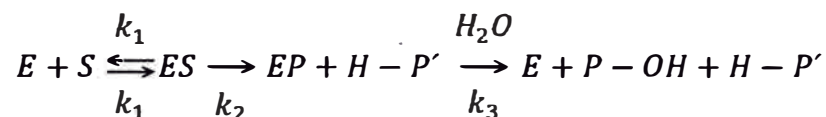
El grado de hidrólisis se define como la relación del número de enlaces peptídicos libres o desligados (número de grupos amino libres formados durante la proteólisis) expresado como equivalentes de hidrólisis (h), en relación con el número total de enlaces peptídicos de la proteína antes de la hidrólisis (h_{tot}).

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100$$

2.4.3. Etapas de la hidrólisis enzimática

La hidrólisis proteolítica no se desarrolla en una sola reacción. Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad a este tipo de procesos.

Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), y después la rotura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos. Estos tres pasos se representan esquemáticamente como sigue:

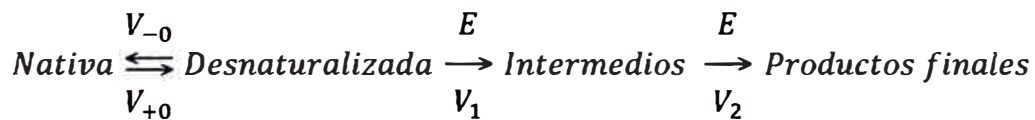


E: enzima, S: sustrato, P,P': péptidos resultantes, k_x : constante velocidad de reacción

Para la hidrólisis de proteína, la unión sustrato-enzima es esencial. En el caso de proteínas globulares, la mayoría de los enlaces peptídicos están localizados en el

interior de la proteína y no son accesibles para la enzima, por esto, se considera que para proteínas globulares es necesario efectuar la desnaturalización de la proteína antes de proceder a hidrolizarla, ya que después de la desnaturalización estarán expuestos más enlaces peptídicos.

En solución, las proteínas en estado plegado (nativo) y no plegado (desnaturalizadas) están en equilibrio. Solamente las moléculas no plegadas son susceptibles a degradación por enzimas proteolíticas, como se representa esquemáticamente como sigue:



V_x : velocidades de reacción, E: enzima

Si la velocidad de desnaturalización ($V_0 = V_{+0} - V_{-0}$) es menor que V_1 , la etapa de desnaturalización es la etapa limitante de la velocidad de hidrólisis y cada proteína desnaturalizada será rápidamente hidrolizada hasta los productos finales. El hidrolizado resultante, además de contener ambas proteínas intactas, contendrá los productos finales, aunque serán deficientes en péptidos de tamaños intermedios. Este tipo de reacción está designada como una reacción “en etapas sucesivas”.

Si, además, la desnaturalización de la proteína es más rápida que la hidrólisis ($V_1 < V_0$), las moléculas de la proteína serán degradadas a intermedios pero posteriormente son degradadas lentamente en productos finales. Este tipo de reacción es llamada de “cremallera”, obteniéndose un hidrolizado que contiene principalmente péptidos de tamaño intermedio. Ambos mecanismos de hidrólisis están implicados en la mayoría de las reacciones proteolíticas.

Si la proteína se desnaturaliza irreversiblemente antes de la hidrólisis, el número de enlaces de péptidos disponibles se incrementa notablemente y la degradación de la proteína debería proceder de acuerdo con un tipo de reacción “cremallera”. Para estas proteínas desnaturalizadas otros factores tales como la disminución de la solubilidad media influyen en la velocidad de reacción inicial.

2.4.4. Variables de Control del proceso de hidrólisis enzimática

Debe establecerse la relación [proteína]/[proteasa] una vez que se ha efectuado un posible pretratamiento de la proteína si es necesario. A continuación deben ser definidas las condiciones de la reacción del proceso de hidrólisis. Las principales variables que determinan el resultado de la reacción son:

- Temperatura
- pH
- Relación enzima-sustrato o concentración de ambas
- Tiempo de reacción.

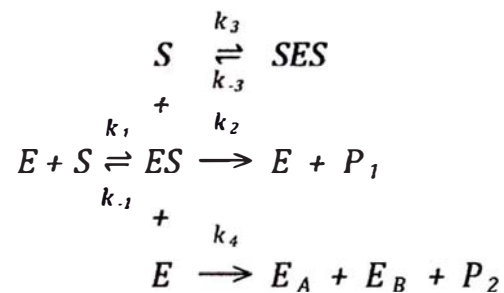
Los primeros 3 factores determinan la velocidad de reacción y pueden influir en la especificidad de la enzima. El tiempo de reacción solamente determina el grado final de hidrólisis. Los efectos interactivos entre los parámetros de la hidrólisis también influyen en la composición del hidrolizado.

Si el proceso de hidrólisis no se controla, el pH de la solución cambiará después del inicio de la hidrólisis debido a la formación de grupos aminos nuevos, los cuales son capaces de liberar o aceptar protones, dependiendo del pH de la hidrólisis. A un pH bajo todos los grupos amino están protonados y solamente parte de los grupos carboxilo están desprotonados, resultando en una captación neta de protones por cada enlace peptídico roto, causando un incremento del pH. A pH neutro y alcalino la hidrólisis resulta en una disminución de pH, pues todos los carboxilos están desprotonados y solamente parte de los grupos amino están protonados.

Con el fin de prevenir un cambio de pH durante la hidrólisis, la reacción debería llevarse a cabo en un sistema buffer o en un sistema de pH-estático en el cual el pH se fija en el valor deseado.

2.5. Modelo Cinético de la Hidrólisis Enzimática de clara de huevo con pepsina

El mecanismo de la reacción de hidrólisis enzimática de la clara de huevo mediante la inhibición de sustrato y la inactivación de la enzima se puede modelar como:



Donde:

E, S – Concentraciones de Enzima libre y Substrato

ES, SES – Complejo Intermediario Enzima-Substrato

P₁, P₂ – Productos finales de la reacción enzimática

k₁, k₋₁, k₂, k₃, k₋₃, k₄ – Constantes de la velocidad de reacción

La correspondiente velocidad de reacción depende de la etapa irreversible:

$$v = S_0 \frac{dh}{dt} = k_2[ES] \quad (1)$$

Se asume que el balance de reacción se realiza en estado cuasi-estacionario, los siguientes balances de masa de los complejos ES y SES se definen como:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[ES]}{dt} &= k_1[E][S] + k_3[SES] - [E][S] - (k_{-1}[ES] + k_2[ES] + k_3[S][ES]) \\
 &= 0
 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\frac{d[SES]}{dt} = k_3[S][ES] + k_{-3}[SES] = 0 \quad (3)$$

Las combinaciones de las ecuaciones (2) y (3) siguiendo el mecanismo cinético para el proceso de inactivación están dadas por:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad (4)$$

$$[SES] = \frac{[E][S]^2}{K_M K_S} \quad (5)$$

Donde:

K_M : Coeficiente de Michaelis-Menten

K_S : Coeficiente de inhibición del sustrato

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (6)$$

$$K_S = \frac{k_{-3}}{k_3} \quad (7)$$

La concentración total de la enzima (e) expresada en un momento determinado es:

$$e = [E] + [ES] + [SES] \quad (8)$$

La sustitución de las ecuaciones (4) y (5) en la ecuación (8) conlleva a la expresión de la concentración de la enzima libre y realizando una simplificación por aproximación ($[S] \approx S_0$):

$$[E] = \frac{K_M K_S e}{K_M K_S + K_S [S] + [S]^2} = \frac{K_M e}{K_M + S_0 + S_0^2 / K_S} \quad (9)$$

Si el proceso de inhibición por el sustrato es el controlante:

$$K_M \leq S_0 + S_0^2 / K_S$$

La ecuación (9) es reducida a:

$$[E] = \frac{K_M K_S e}{K_S S_0 + S_0^2} \quad (10)$$

La ecuación (4) es reducida a:

$$[ES] = \frac{K_S e}{K_S + S_0} \quad (11)$$

La ecuación cinética para el proceso de desactivación enzimática está dada por el siguiente mecanismo:

$$-\frac{de}{dt} = k_4 [E][ES] \quad (12)$$

El resultado de la ecuación (1) dividida entre la ecuación (12) es:

$$-\frac{dh}{de} = \frac{k_2}{k_4 S_0 [E]} \quad (13)$$

Sustituyendo la ecuación (10) en la ecuación (13):

$$-\frac{dh}{de} = \frac{k_2(K_S S_0 + S_0^2)}{k_4 K_M K_S S_0} \frac{1}{e} \quad (14)$$

La integración de la ecuación (14) desde $h = 0$ hasta h ; $e = e_0$ hasta e nos da la expresión de la concentración de enzima activa:

$$e = e_0 \cdot \exp\left(-\frac{k_4 K_M K_S S_0}{k_2(K_S S_0 + S_0^2)} \cdot h\right) \quad (15)$$

Hasta aquí es posible obtener la siguiente ecuación de velocidad de reacción combinando las ecuaciones (15) y (11) en (1):

$$v = s_0 \frac{dh}{dt} = \frac{k_2 K_S e_0}{K_S + S_0} \exp\left(-\frac{k_4 K_M K_S}{k_2(K_S + S_0)} \cdot h\right) \quad (16)$$

Si:

$$a = \frac{k_2 K_S e_0}{K_S + S_0}, \quad b = \frac{k_4 K_M K_S}{k_2(K_S + S_0)} \quad (17)$$

Entonces:

$$v = a S_0 \exp(-bh) \quad (18)$$

$$\frac{dh}{dt} = a \exp(-bh) \quad (19)$$

$$h = \frac{1}{b} \ln(1 + abt) \quad (20)$$

III. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNA DE CLARA DE HUEVO

En este capítulo se mostrará cuál es el procedimiento para obtener la base de los datos experimentales y luego se indicará el método de medición de la misma.

3.1. Procedimiento general del experimento

- La clara de huevo fue disuelta en agua destilada a diferentes concentraciones.
- La proteína en la solución fue térmicamente desnaturalizada a 90 °C en un baño de agua durante 15 minutos.
- El pH de las soluciones desnaturalizadas fue ajustado a 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 con una solución de HCL 1.0 mol/L
- La reacción de hidrólisis fue llevada a cabo adicionando pepsina para llegar a concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5 y 0.8 g/L y a temperaturas de 30, 35, 40 y 45°C en un tanque reactor agitado tipo batch.
- El pH fue mantenido constante adicionando una solución de HCL 1M mediante un titulador potenciométrico automático.
- La inactivación de la pepsina fue lograda incrementando el pH a 7 con una solución de NaOH 1M
- Las proteínas hidrolizadas fueron muestreadas a diferentes tiempos para la determinación del grado de hidrólisis.
- La solución proteica hidrolizada fue centrifugada a 4000 rpm durante 15 minutos

3.2. Técnica de medición de datos experimentales

El porcentaje de grado de hidrólisis (DH) fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DH(\%) = \frac{N - N_0}{h_{tot}} \cdot 100$$

Donde:

N: Cantidad en el substrato de grupos amino desligados de los productos proteolíticos (mmol/g)

N₀: Cantidad original de grupos amino desligados en el substrato (mmol/g)

h_{tot}: Cantidad de aminoácidos totales presentes en la proteína por gramo expresado en equivalentes de hidrólisis total.

La medición de N y N₀ fue realizada mediante el método espectrofotométrico con Ninhidrina, el cual es un método para cuantificar la cantidad de aminoácidos libres de una solución proteica.

La medición de h_{tot} fue realizada mediante el análisis de aminoácidos sumando los milimoles de cada aminoácido individual por gramo de proteína de clara de huevo (mmol/g).

3.3. Datos experimentales

3.3.1. Variación de la temperatura:

Constantes: $S_0 = 105 \text{ g/L}$

$e_0 = 0.5 \text{ g/L}$

$\text{pH} = 2$

Tabla N° 3.1: Grado de Hidrólisis con variación de la temperatura

| t (min) | TEMPERATURA (°C) | | | |
|---------|------------------|-------|------|------|
| | 30 | 35 | 40 | 45 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 10.00 | 5.00 | 5.37 | 5.81 | 6.26 |
| 20.00 | 5.59 | 6.19 | 6.59 | 6.96 |
| 30.00 | 5.89 | 6.52 | 6.85 | 7.44 |
| 40.00 | 6.19 | 6.74 | 7.00 | 7.67 |
| 60.00 | 6.44 | 7.07 | 7.37 | 7.93 |
| 80.00 | 6.59 | 7.26 | 7.56 | 8.22 |
| 100.00 | 6.85 | 7.37 | 7.63 | 8.37 |
| 120.00 | 6.96 | 7.56 | 7.81 | 8.44 |
| 140.00 | 7.11 | 7.67 | 8.00 | 8.56 |
| 160.00 | 7.19 | 7.78 | 8.15 | 8.70 |
| 180.00 | 7.26 | 7.815 | 8.22 | 8.74 |

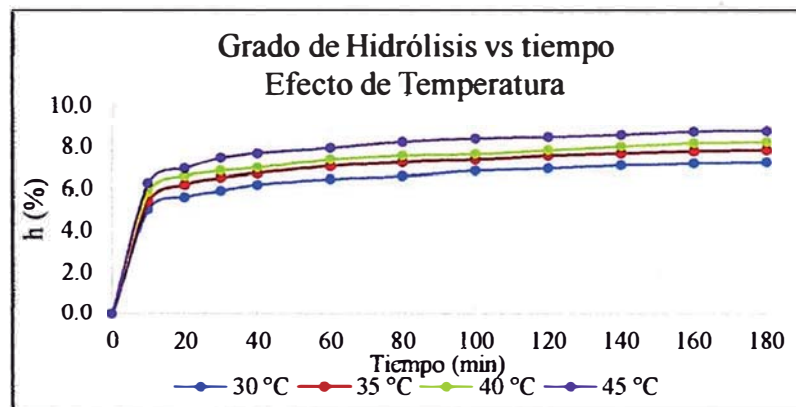


Fig. N° 3.1: Efecto de la temperatura sobre el grado de hidrólisis

3.3.2. Variación de pH:

Constantes $S_0 = 87.5 \text{ g/L}$
 $e_0 = 0.5 \text{ g/L}$
 $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabla N° 3.2: Grado de Hidrólisis con variación del pH

| t (min) | pH | | | |
|---------|------|------|------|------|
| | 3 | 2 | 2.5 | 1.5 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 10.00 | 1.93 | 3.08 | 4.08 | 5.34 |
| 20.00 | 2.51 | 4.29 | 5.16 | 6.19 |
| 30.00 | 2.96 | 4.80 | 5.68 | 6.49 |
| 40.00 | 3.20 | 5.10 | 5.86 | 6.82 |
| 60.00 | 3.35 | 5.37 | 6.10 | 7.03 |
| 80.00 | 3.50 | 5.65 | 6.28 | 7.12 |
| 100.00 | 3.77 | 5.83 | 6.46 | 7.40 |
| 120.00 | 3.86 | 6.10 | 6.58 | 7.52 |
| 140.00 | 4.02 | 6.28 | 6.76 | 7.61 |
| 160.00 | 4.08 | 6.46 | 6.94 | 7.70 |
| 180.00 | 4.17 | 6.55 | 7.12 | 7.76 |

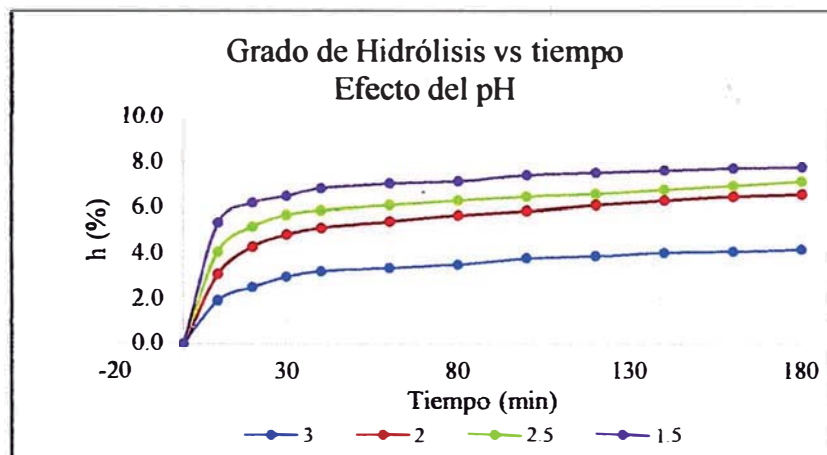


Fig. N° 3.2: Efecto del pH sobre el grado de hidrólisis

3.3.3. Variación de Concentración de Substrato:

Constantes: $\text{pH} = 2.0$

$e_0 = 0.5 \text{ g/L}$

$T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$

Tabla N° 3.3: Grado de Hidrólisis con variación del substrato

| t (min) | Conc. Substrato (g/L) | | | |
|---------|-----------------------|-------|------|------|
| | 350 | 262.5 | 175 | 105 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 10.00 | 4.51 | 4.80 | 5.05 | 5.31 |
| 20.00 | 5.17 | 5.44 | 5.87 | 6.07 |
| 30.00 | 5.48 | 5.95 | 6.22 | 6.40 |
| 40.00 | 5.72 | 6.28 | 6.44 | 6.61 |
| 60.00 | 6.13 | 6.56 | 6.79 | 6.97 |
| 80.00 | 6.50 | 6.79 | 7.08 | 7.28 |
| 100.00 | 6.67 | 6.93 | 7.20 | 7.47 |
| 120.00 | 6.73 | 7.06 | 7.26 | 7.51 |
| 140.00 | 6.83 | 7.14 | 7.41 | 7.57 |
| 160.00 | 6.89 | 7.20 | 7.45 | 7.61 |
| 180.00 | 6.97 | 7.28 | 7.49 | 7.67 |

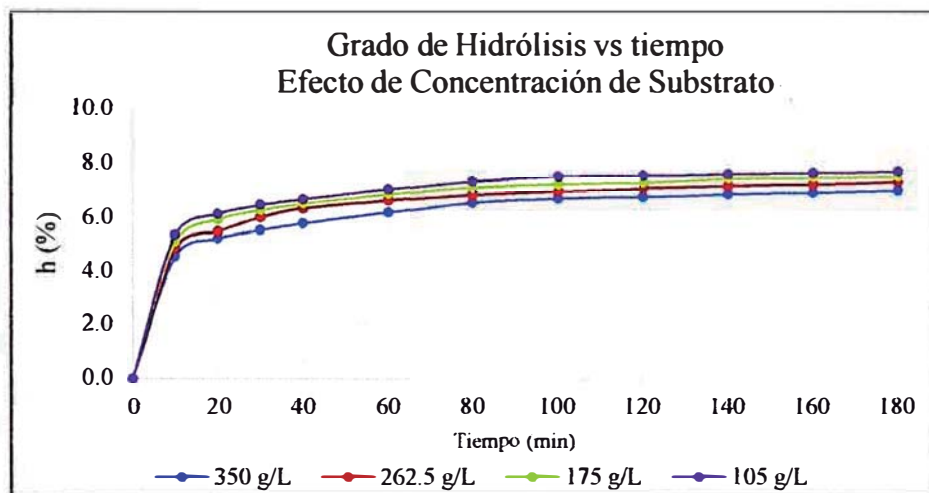


Fig. N° 3.3: Efecto de la concentración del substrato sobre el grado de hidrólisis

3.3.4. Variación de Concentración de Enzima:

Constantes: $S_0 = 87.5 \text{ g/L}$

pH = 2.0

T = 35 °C

Datos:

Tabla N° 3.4: Grado de Hidrólisis con variación de la enzima

| t (min) | Conc. Enzima (g/L) | | | |
|---------|--------------------|------|------|------|
| | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.8 |
| 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 10.00 | 4.15 | 4.86 | 5.33 | 5.52 |
| 20.00 | 5.02 | 5.65 | 6.18 | 6.47 |
| 30.00 | 5.33 | 5.97 | 6.47 | 6.89 |
| 40.00 | 5.60 | 6.23 | 6.57 | 7.08 |
| 60.00 | 5.86 | 6.52 | 6.94 | 7.26 |
| 80.00 | 6.10 | 6.79 | 7.10 | 7.52 |
| 100.00 | 6.26 | 6.86 | 7.31 | 7.68 |
| 120.00 | 6.31 | 7.00 | 7.47 | 7.82 |
| 140.00 | 6.39 | 7.10 | 7.63 | 7.87 |
| 160.00 | 6.52 | 7.18 | 7.66 | 7.89 |
| 180.00 | 6.57 | 7.29 | 7.76 | 7.97 |

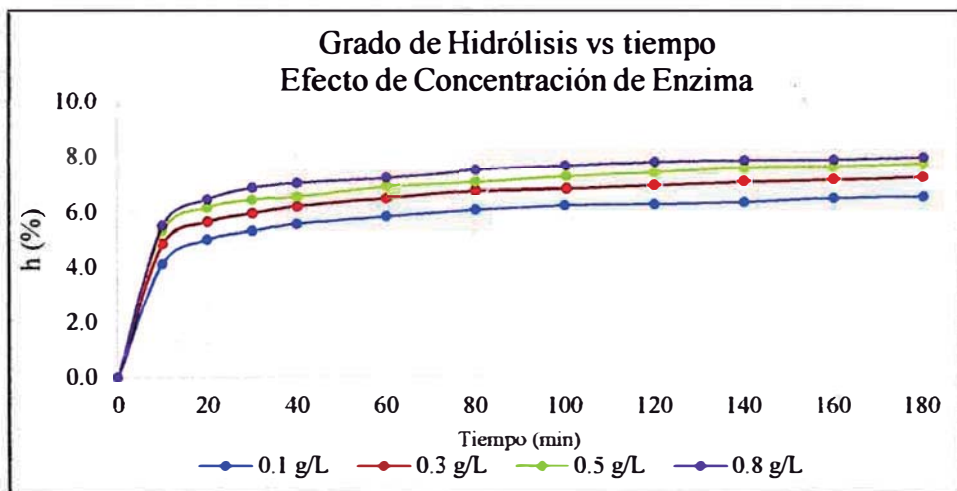


Fig. N° 3.4: Efecto de la concentración de enzima sobre el grado de hidrólisis

3.4. Análisis de datos experimentales que afectan al Grado de Hidrólisis

3.4.1. Efecto de la temperatura

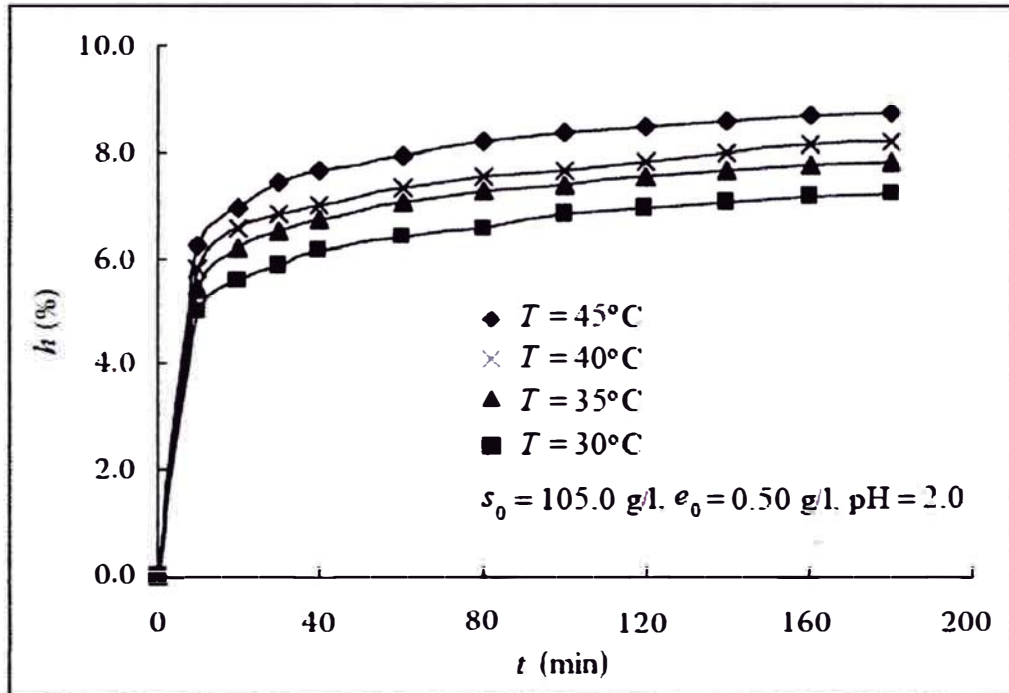


Figura N° 3.5. Curvas de Hidrólisis a diferentes temperaturas

El proceso de hidrólisis a diferentes temperaturas se muestra en la figura N° 3.5. Los valores de DH aumentaron rápidamente de 0 a 6,24 dentro de 10 minutos y aumentaron lentamente desde los 10 a los 180 minutos. Se obtuvo el valor más alto de DH a 45° C, se mostró una menor a 30° C. El perfil de temperatura-actividad de la pepsina porcina nativa podría conservarse de 30° C a 45° C durante el proceso enzimático con EWP.

Generalmente, el DH aumenta con el aumento de la temperatura en un mismo tiempo de reacción debido a una temperatura más alta que respalda las actividades de desglose, incremento de actividad enzimática de proteína y reducción de la energía de activación para el substrato en la conversión del producto (Whitaker 2000). Sin embargo, cada proteasa tiene un rango de temperatura adecuada para mantener la actividad enzimática (Smith et al., 1991). La pepsina porcina libre demostró una alta estabilidad a 40° C en el uso de solución de hemoglobina de 10

g/l en 0,01 mol/l de HCl de 5 horas, pero la actividad se redujo en 40% a 50° C (Altun & Cetinus 2007). Este resultado indica que una alta temperatura puede resultar en transición conformacional y desactivación de la pepsina (Kozlov et al. 1979).

3.4.2. Efecto del pH

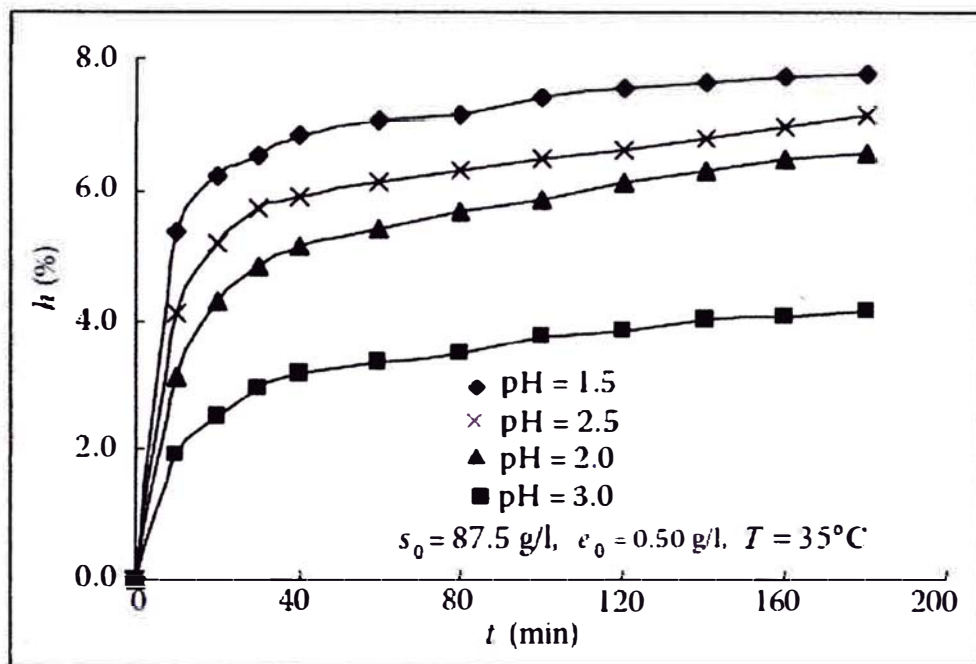


Figura N° 3.6. Curvas de hidrólisis a diferentes niveles de pH

El DH de proteína de la clara de huevo hidrolizada por pepsina en valores de pH diferentes se muestra en la figura N° 3.6. Los resultados mostraron que las tasas de hidrólisis se incrementaron con el valor de pH, y que el DH es mayor a pH 2.0. Las tasas de la reacción disminuyeron más rápidamente con el tiempo a pH 3,0. Cada enzima tiene un intervalo apropiado de pH que ayuda a mantener su estructura tridimensional en el sitio activo y proporcionar grupos ionizables esenciales (Whitaker 2000). Si el valor de pH es superior a 5.0, la pepsina puede ser desnaturizada y podría resultar incluso en la inactivación (Kozlov et al. 1979; Pohl & Dunn 1988). Esto concuerda con la obra de (Christensen 1955;

Schlamowitz & Peterson 1959) quien informó que la pepsina tenía actividad óptima con proteínas nativas a pH aproximadamente 2.0 y en pH 1.5–3.5 con algunas proteínas desnaturalizadas.

3.4.3. Efecto de la concentración del sustrato

Las curvas de DH de proteína de huevo a varias concentraciones iniciales (105.0 g/l, 175.0 g/l, 262.5 g/l, and 350.0 g/l) se muestran en la figura N° 3.7.

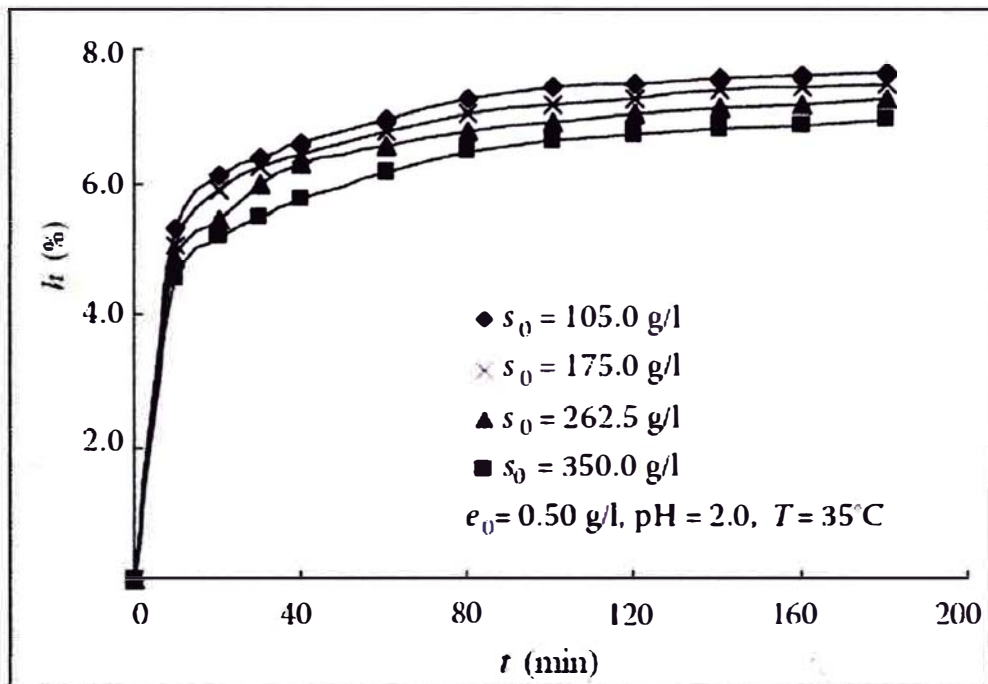


Figura N° 3.7. Curvas de hidrólisis a diferentes concentraciones de sustrato

El DH se redujo cuando la concentración del sustrato aumentó mientras que la reacción enzimática a menor concentración de sustrato ($S_0 = 105,0$ g/L) mostró una tasa de reacción con DH alcanzando 6,93 en 180 minutos. Por esta razón, en una concentración de enzima constante y una menor concentración del sustrato, la concentración del sustrato es el factor limitante, así aumentará la velocidad de reacción de la enzima con la creciente concentración del sustrato. Sin embargo,

en concentraciones más altas, el sustrato a menudo actuará como un inhibidor de callejón sin salida, especialmente cuando se estudia la reacción en la dirección no natural (Leskovacs 2004).

La inhibición de sustrato no puede ser ignorada en el sistema de hidrólisis EWP-pepsina porque no se pueden descomponer los complejos intermedios inactivos de la enzima y el sustrato excesivo para producir hidrolizados (Yasnoff & Toro 1953; Humphreys & Fruton 1968; Deisseroth & Dounce 1970).

3.4.4. Efecto de la concentración de la enzima

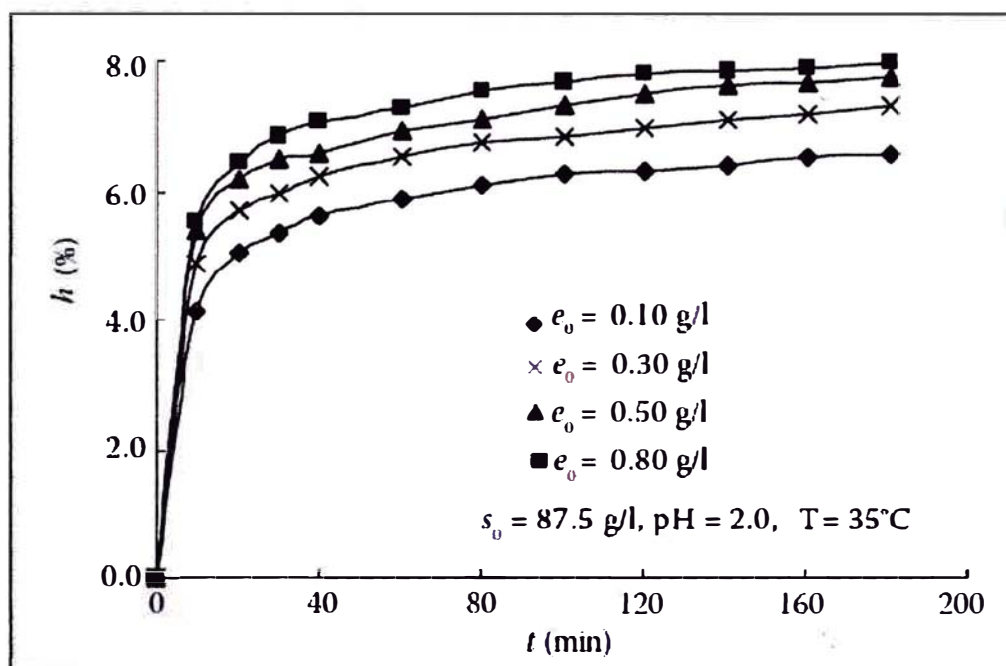


Figura N° 3.8. Curvas de hidrólisis a diferentes concentraciones de sustrato

Se observan altos valores de DH conforme aumenta la concentración de la enzima pepsina a condiciones constantes ($S_0 = 87.5$ g/L, pH = 2.0, T = 35°C). Esto significa que cuando una concentración de sustrato está suficientemente disponible, un incremento de concentración de enzima también incrementará la

velocidad de reacción. Los resultados demostraron que la tasa de velocidad de reacción estuvo en proporción directa a la velocidad de formación de los complejos intermediarios quienes son a su vez, dependientes de la concentración de enzima.

Grandes aumentos en la concentración de enzima no ocasionará incrementos importantes en la velocidad de reacción como una función de la concentración de enzima. Además, se generan potentes péptidos de la clara de huevo con pepsina porcina ya que cuenta con una gran especificidad enlazándose especialmente en el grupo carboxil de los residuos de fenilalanina y leucina de dicho sustrato. Estos resultados indican que una alta concentración de pepsina no es adecuada para la reacción de hidrólisis enzimática.

3.4.5. Efectos de S_0 , e_0 y T sobre los parámetros a y b

De acuerdo a las curvas de hidrólisis en curso con el tiempo dadas en las figuras (12), (14) y (15), los valores sobre los parámetros a y b son calculados usando el análisis de regresión no lineal de acuerdo a la ecuación (20):

$$h = \frac{1}{b} \ln(1 + abt) \quad (20)$$

La secuencia de cálculo es la siguiente:

1. En las figuras (12), (14) y (15) se tienen los datos correspondientes a $t_{i,\text{exp}}$ vs $h_{i,\text{exp}}$ para condiciones constantes de S_0 , e_0 o T según sea el caso de cada tipo de gráfico. Donde:
 $T_{i,\text{exp}}$: tiempo i experimental
 $h_{i,\text{exp}}$: grado de hidrólisis experimental correspondiente al tiempo i
2. Se asumen los valores de a y b
3. Para cada serie de $t_{i,\text{exp}}$ se calcula el valor de $h_{i,\text{calc}}$. Donde:
 $h_{i,\text{calc}}$: grado de hidrólisis calculado mediante la eq. (20), correspondiente al tiempo i .

4. Se halla mediante regresión no lineal los valores a y b que satisfacen la siguiente función:

$$\min \left(\sum_i (h_{i,exp} - h_{i,calc})^2 \right)$$

Los valores de los parámetros cinéticos a y b calculados que corresponden a los valores de S_0 , e_0 y T se muestran en la siguiente tabla:

Tabla N° 3.5: Valores de los parámetros cinéticos a y b a diferentes condiciones del proceso (pH = 2)

| T (°C) | s_0 (g/L) | e_0 (g/L) | a (min ⁻¹) | b |
|--------|-------------|-------------|--------------------------|-------|
| 35 | 87.5 | 0.10 | 19.82 | 1.257 |
| 35 | 87.5 | 0.30 | 49.07 | 1.269 |
| 35 | 87.5 | 0.50 | 85.84 | 1.264 |
| 35 | 87.5 | 0.80 | 113.5 | 1.248 |
| 35 | 105.0 | 0.50 | 72.74 | 1.245 |
| 35 | 175.0 | 0.50 | 50.27 | 1.226 |
| 35 | 262.5 | 0.50 | 32.85 | 1.204 |
| 35 | 350.0 | 0.50 | 18.76 | 1.178 |
| 30 | 105.0 | 0.50 | 42.85 | 1.261 |
| 35 | 105.0 | 0.50 | 84.56 | 1.248 |
| 40 | 105.0 | 0.50 | 109.4 | 1.232 |
| 45 | 105.0 | 0.50 | 207.7 | 1.218 |

Se puede observar que el valor de a depende de la concentración inicial de enzima e_0 , concentración inicial del sustrato S_0 y la temperatura T . El parámetro e_0 es el más influyente y directamente proporcional al valor de a .

El valor de b permanece constante respecto a la variación de e_0 con un valor promedio de 1.260 y decrece con el aumento de S_0 y la temperatura T , S_0 es el

parámetro de control el más influyente e inversamente proporcional sobre el valor de b .

Las consideraciones del efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos a y b son suplementarios para el mecanismo cinético de la hidrólisis enzimática de proteínas.

3.5. Determinación de las constantes cinéticas del mecanismo de hidrólisis enzimática y el mecanismo de desactivación enzimática

De acuerdo a las expresiones para a y b provenientes de la ecuación (17) derivadas de la inhibición por el sustrato:

$$a = \frac{k_2 K_S e_0}{K_S S_0 + S_0^2}, \quad b = \frac{k_4 K_M K_S}{k_2 (K_S + S_0)} \quad (17)$$

Se graficarán dos líneas rectas reacomodando las ecuaciones anteriores de la siguiente forma:

$$\frac{1}{a} = \frac{K_S S_0 + S_0^2}{k_2 K_S} \frac{1}{e_0}, \quad \frac{1}{b} = \frac{k_2}{k_4 K_M K_S} \cdot S_0 + \frac{k_2}{k_4 K_M} \quad (17)$$

De esta manera se pueden graficar dos rectas a^{-1} vs e_0^{-1} y b^{-1} vs S_0 cuyos datos se pueden obtener de la tabla N° 3.5.

Para $T = 35 \text{ °C}$ y $S_0 = 87.5 \text{ g/L}$:

Tabla N° 3.6

| e_0 | a | $1/e_0$ | $1/a$ |
|-------|-------|---------|-------|
| 0.1 | 19.82 | 10.00 | 0.05 |
| 0.3 | 49.07 | 3.33 | 0.02 |
| 0.5 | 85.84 | 2.00 | 0.01 |
| 0.8 | 113.5 | 1.25 | 0.01 |

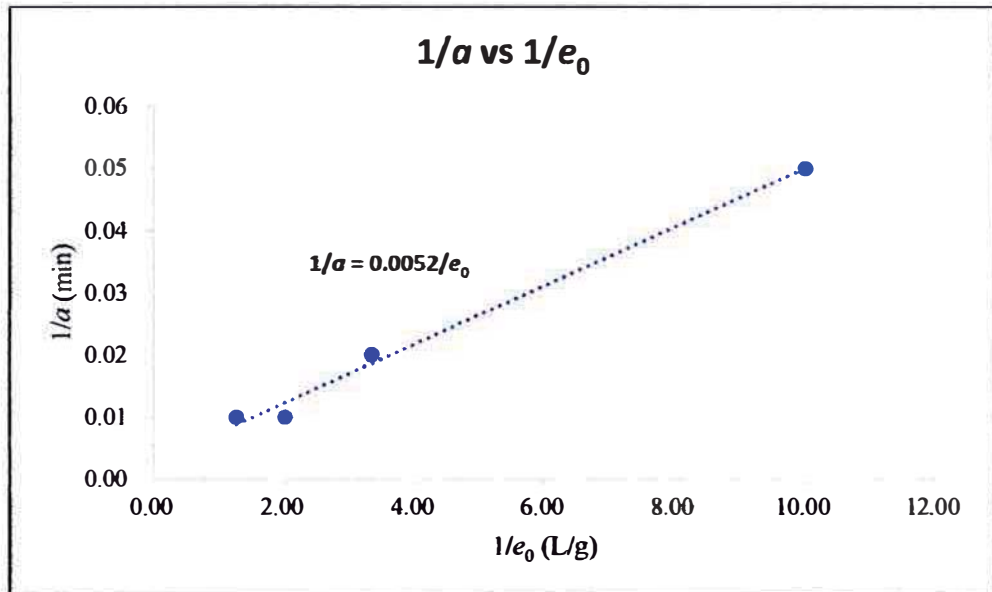


Figura N° 3.9: relación de $1/a$ vs $1/e_0$ con línea de tendencia agregada

La ecuación de la línea recta conforme a la regresión de la figura N° 3.9 es:

$$\frac{1}{a} = \frac{0.0052}{e_0} \quad (21)$$

Esta regresión tiene un coeficiente de determinación r^2 de 0.9941 por lo cual se acepta la ecuación propuesta.

Similarmente para graficar b^{-1} vs S_0 se toman los datos de la tabla N° 3.5 con las siguientes condiciones:

Para $T = 35 \text{ }^\circ\text{C}$ y $e_0 = 0.5 \text{ g/L}$:

Tabla N° 3.7

| S_0 | b | $1/b$ |
|-------|-------|-------|
| 105 | 1.245 | 0.80 |
| 175 | 1.226 | 0.82 |
| 262.5 | 1.204 | 0.83 |
| 350 | 1.178 | 0.85 |

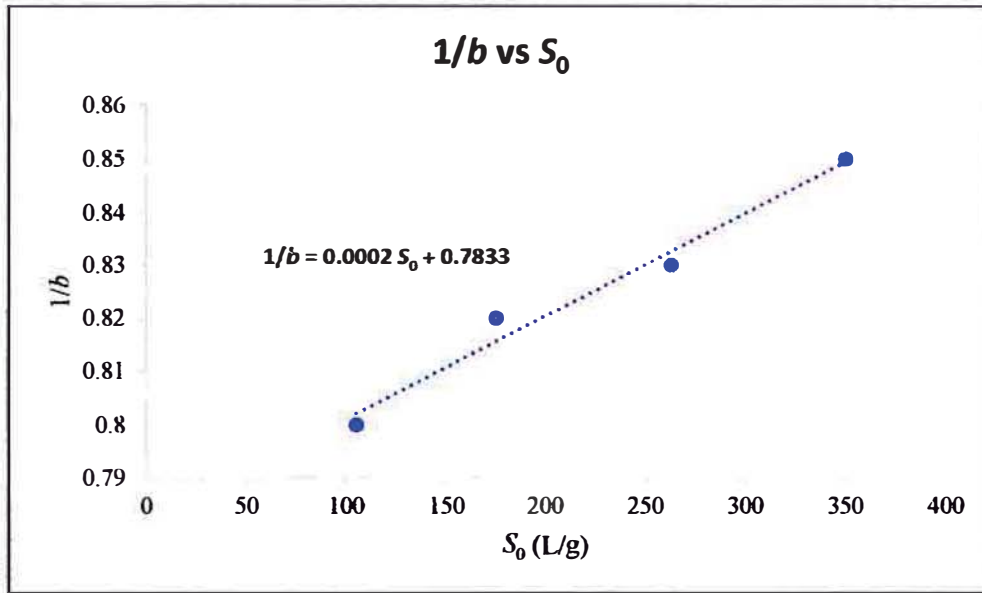


Figura N° 3.10: relación de $1/b$ vs S_0 con línea de tendencia agregada

La ecuación de la línea recta conforme a la regresión de la figura N° 3.10 es:

$$\frac{1}{b} = 0.0002 S_0 + 0.7833 \quad (22)$$

Esta regresión tiene un coeficiente de determinación r^2 de 0.9978 por lo cual se acepta la ecuación propuesta.

Los buenos resultados de los coeficientes de determinación de las ecuaciones (21) y (22) demuestran la validez del modelo cinético del sistema clara de huevo con pepsina.

Comparando términos análogos entre las ecuaciones (17), (21) y (22) se tiene el sistema de ecuaciones de 3 incógnitas con tres variables:

$$\frac{K_S S_0 + S_0^2}{k_2 K_S} = 0.0052 \quad (23)$$

$$\frac{k_2}{k_4 K_M K_S} = 0.0002 \quad (24)$$

$$\frac{k_2}{k_4 K_M} = 0.7833 \quad (25)$$

La solución al sistema de ecuaciones es:

$$K_S = 3916.5 \text{ g/L}$$

$$k_2 = 17202.86 \text{ min}^{-1}$$

$$k_d = k_1 K_M = 21962.03 \text{ min}^{-1}$$

Donde k_d es la constante de inactivación de enzima que depende directamente del valor de k_1 el cual es la constante cinética de desactivación enzimática.

Como se ha mencionado anteriormente, los valores de a y b también dependen de la temperatura y para determinar la relación que tienen ambos parámetros con la temperatura se utilizará la relación directa que tiene a con k_2 y ab con k_d según las expresiones de la ecuación 17 para expresarlas mediante la ecuación de Arrhenius:

$$\ln(a) = \frac{E_a}{RT} + A_a \quad (26)$$

$$\ln(ab) = \frac{E_d}{RT} + A_d \quad (27)$$

Donde:

A_a, A_d : Factores de frecuencia

E_a : Energía de activación del mecanismo cinético de hidrólisis enzimática

E_d : Energía de activación del mecanismo cinético de desactivación enzimática

R : Constante de los gases ideales 8.314 J/mol/K

Se pueden graficar dos rectas de a vs T y ab vs T según los datos de la tabla N° 6 con las siguientes condiciones constantes:

$$S_0 = 105 \text{ g/L y } e_0 = 0.5 \text{ g/L:}$$

Tabla N° 3.8

| T (°C) | T (K) | a (min ⁻¹) | b | ab | 1/T (K ⁻¹ ·10 ³) | ln (a) | ln (ab) |
|--------|--------|------------------------|-------|---------|---|-----------|-----------|
| 30 | 303.15 | 42.85 | 1.261 | 54.034 | 3.299 | 3.7577056 | 3.9896107 |
| 35 | 308.15 | 84.56 | 1.248 | 105.531 | 3.245 | 4.4374613 | 4.6590036 |
| 40 | 313.15 | 109.4 | 1.232 | 134.781 | 3.193 | 4.6950109 | 4.9036498 |
| 45 | 318.15 | 207.7 | 1.218 | 252.979 | 3.143 | 5.3360947 | 5.5333049 |

En las figuras N° 3.11 y N° 3.12 se correlacionarán linealmente las relaciones mencionadas:

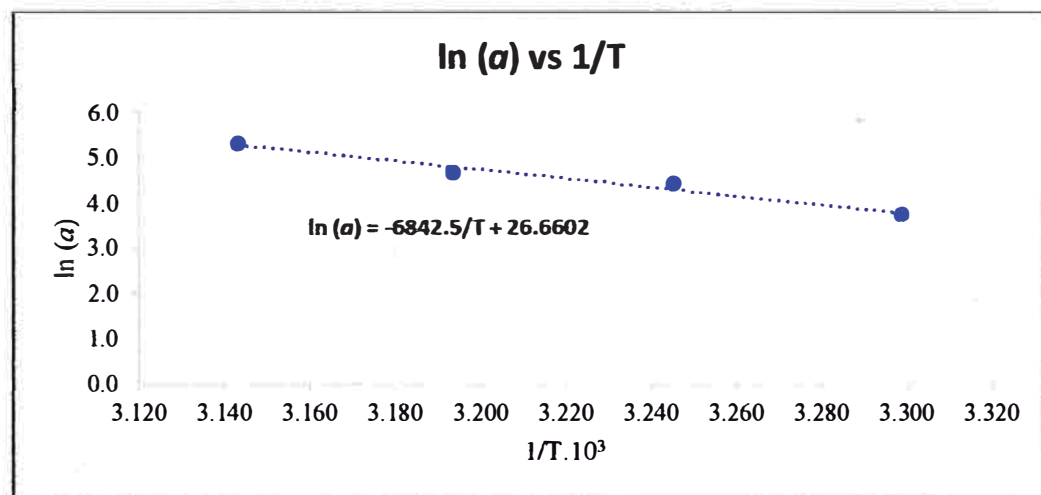


Figura N° 3.11: relación de $\ln(a)$ vs $1/T$ con línea de tendencia agregada

La ecuación de la línea recta conforme a la regresión lineal de la curva de la figura N° 3.11 es:

$$\ln(a) = \frac{-6842.5}{T} + 26.6602 \quad (28)$$

Esta regresión tiene un coeficiente de determinación r^2 de 0.9695 por lo cual se acepta la ecuación propuesta.

Similarmente se graficará $\ln(ab)$ vs $1/T$ a las mismas condiciones de S_0 y e_0 :

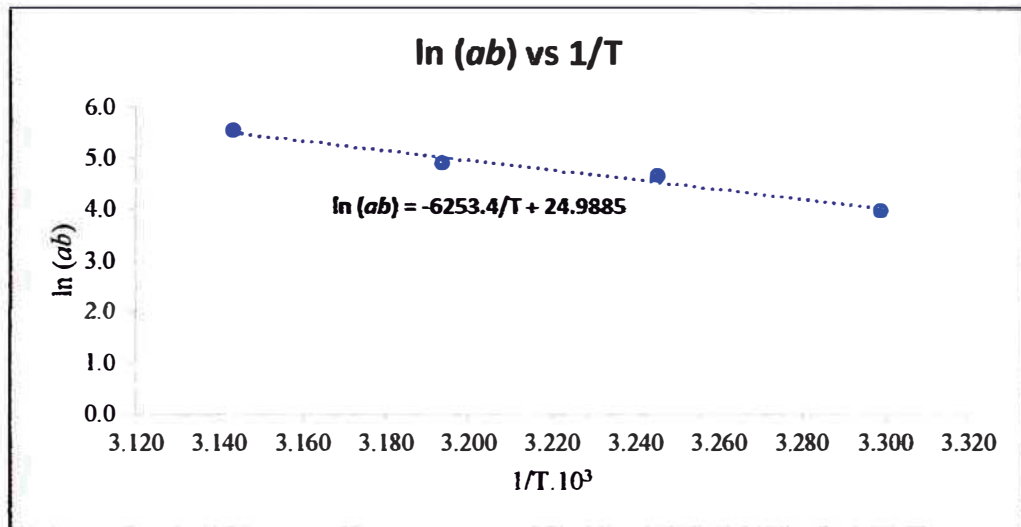


Figura N° 3.12: relación de $\ln(ab)$ vs $1/T$ con línea de tendencia agregada

La ecuación de la línea recta conforme a la regresión lineal de la curva de la figura N° 3.12 es:

$$\ln(ab) = \frac{-6253.4}{T} + 24.9885 \quad (29)$$

Esta regresión tiene un coeficiente de determinación r^2 de 0.9630 por lo cual se acepta la ecuación propuesta.

Comparando términos análogos entre las ecuaciones (26) con (28) y (27) con (29) se determinan las energías de activación:

$$E_a = 56.89 \text{ kJ/mol}$$

$$E_d = 51.99 \text{ kJ/mol}$$

A partir de esta sección se tiene definido completamente el modelo cinético de la ecuación (20) en la cual el valor de h está en función a todos los parámetros de S_0 , e_0 y T , las constantes cinéticas k_2 , k_d y K_S y la variable independiente del tiempo t .

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones y recomendaciones se basan en el contenido del presente informe y se muestra la legitimidad del modelo cinético con el estudio de los datos experimentales.

4.1. Conclusiones

1. Según lo analizado en la sección 3.2 las condiciones óptimas de operación para obtener el máximo rendimiento de hidrólisis enzimática, es decir el mayor porcentaje de grado de hidrólisis en un tiempo determinado son:

$$T = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$$

$$\text{pH} = 2$$

$$S_0 = 87.5 \text{ g/L}$$

$$e_0 = 0.5 \text{ g/L}$$

A continuación se presenta el sustento de cada variable óptima.

Temperatura.

Según lo observado en la figura N° 3.5 se observa un mayor valor de grado de hidrólisis a $T = 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo en el proceso hay una alta probabilidad que la resistencia de la pepsina pierda eficacia ya que su mayor estabilidad se ha evaluado a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Por lo tanto una temperatura adecuada del proceso sin poner en riesgo la pérdida de eficiencia de la enzima con respecto a la temperatura es a una temperatura de $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

pH

Según lo observado en la figura N° 3.6 se observa un mayor grado de hidrólisis a un pH de 1.5, sin embargo el factor limitante es la actividad de la enzima la cual tiene una mayor estabilidad a un pH de 2.

Concentración de substrato S_0

En la figura N° 3.7 se concluye que a menor concentración del substrato, la velocidad de reacción es mayor y alcanza un mayor porcentaje de grado de hidrólisis en un tiempo determinado. Un exceso de concentración de substrato podría causar inhibición de la enzima.

Concentración de enzima e_0

En la figura N° 3.8 se observa que a medida que la concentración de la enzima aumenta, el grado de hidrólisis también aumenta en un tiempo determinado. Adicionalmente una gran cantidad de enzima no favorece al aumento del grado de hidrólisis ya que pueden generar mucha especificidad en los péptidos. El valor de $e_0 = 0.5$ g/L es un valor adecuado y no peligrosamente alto para un adecuado proceso de hidrólisis enzimática.

2. Los datos experimentales comprueban que el modelo cinético de la hidrólisis enzimática de la proteína de clara de huevo es válido dentro del rango de los parámetros de operación realizados:

T entre 30°C y 45 °C

pH entre 1.5 y 3

S_0 entre 87.5 g/L y 350 g/L

e_0 entre 0.1 g/L y 0.8 g/L

Si se deseara abarcar fuera de los límites de operación de dichos parámetros, habría que realizar una prueba experimental para corroborar las constantes del modelo cinético.

4.2. Recomendaciones

1. El tipo de operación de acuerdo a las características del proceso y dado que el volumen deseado de producción no representa mayor complejidad para el adecuado control de los parámetros de operación, por lo tanto se recomienda que el tipo de operación del reactor de hidrólisis enzimática sea del tipo de operación batch u operación por lotes.
2. Se recomienda realizar una prueba piloto con el siguiente esquema de producción con capacidades mínimas comerciales de los diferentes equipos involucrados.

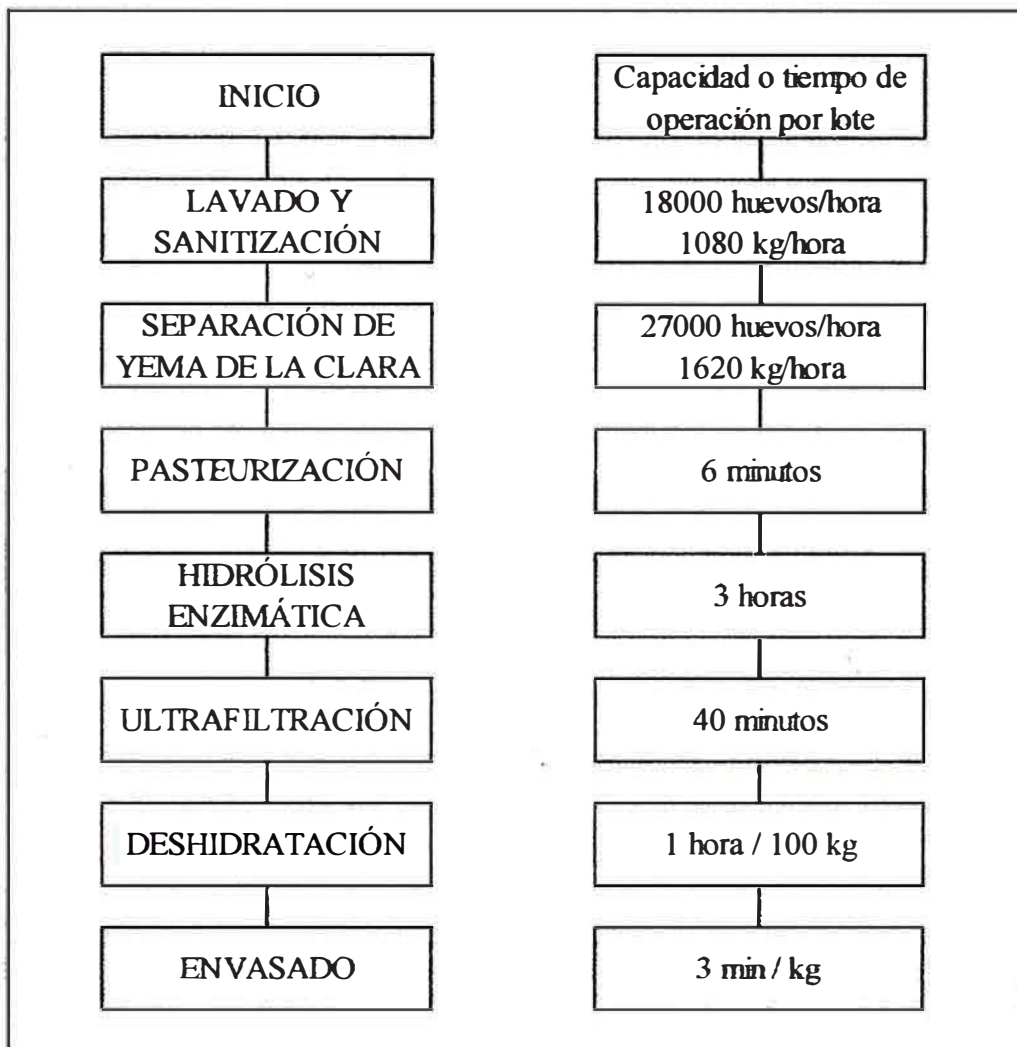


Figura N° 4.1: Esquema de producción de clara de huevo hidrolizada

V. BIBLIOGRAFIA

1. Abdou A.; Kim M.; Sato K. Functional Proteins and Peptides of Hen's Egg Origin.
2. Adler-Nissen J. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. 1979. Vol. 27. Páginas 1256-1262.
3. Bailey J.; Ollis D. *Biochemical Engineering Fundamentals*. Página 35.
4. Benítez R.; Ibarz A.; Pagan J. Hidrolizados de Proteína: Procesos y Aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 2008. Vol 42. Páginas 227-236.
5. Chi Y.; Tian B.; Sun B.; Guo M. Enzymatic Hydrolysis Conditions for Egg White Proteins. 2006. Vol 58. Páginas 143-146.
6. GEA Filtration. Filtración por Membranas. Brochure.
7. Guadix A.; Guadix E.; Páez-Dueñas M.; González-Tello P.; Camacho F. Procesos Tecnológicos y Métodos de Control en la Hidrólisis de Proteínas. *ARS Pharmaceutica*. 2000. Vol 41. Páginas 79-89.
8. Huopalahti R.; López-Fandiño R.; Anton M.; Schade R. Bioactive Egg Compounds. Página 33.
9. Instituto de Estudios del Huevo. El Gran Libro del Huevo. Página 26.
10. Instituto de Estudios del Huevo. El Libro del Huevo. Página 21.
11. Jones B. Factors for Converting Percentages of Nitrogen in Foods and Feeds into Percentages of Proteins. U.S. Department of Agriculture. 1931. Circular 183. Páginas 1-22.
12. Lewis J.; Snell N.; Hirschmann D.; Fraenkel-Conrat H. Amino Acid Composition of Egg Proteins. *J. of Biochemical Chemistry*. 1950. Vol 183. Páginas 23-35.

13. Miguel M.; López-Alonso R.; Recio I.; Ramos M.; Aleixandre A. Para: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Péptidos Bioactivos Derivados de Proteínas de Clara de Huevo Mediante Hidrólisis Enzimática. Patente ES-2253036. 2007. Páginas 1-25.
14. Mine Y. Egg Bioscience and Biotechnology. Página 141.
15. Moore S.; Stein W. A Modified Ninhydrin Reagent for the Protometric determination of Amino Acids and Related Compounds. J. of Biochemical Chemistry. 1954. Vol 211. Páginas 907-913.
16. Novozymes. Enzymes at Work. Brochure.
17. Ruan CH.-Q.; Chi Y.-J.; Zhang R.-D. Kinetics of Hydrolysis of Egg White Protein by Pepsin. Czech J. Food Science. 2010. Vol 28. Páginas 355-363.
18. Stadelman W.; Cotterill O. Egg Science and Technology. Página 105.