



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Producción y caracterización parcial de hidrolizados de proteínas
de yema de huevo libre de lecitina.**

Tesis

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.Q. Silvia Norieth Rios Morales

Asesores:

Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez

Dra. Rosa María Oliart Ros

Dr. Edmundo Brito de la Fuente

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez, infinitas gracias por todo el apoyo brindado, por la paciencia, por los conocimientos compartidos y por siempre estar disponible para cualquier acontecimiento. Ha sido una excelente asesora.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el apoyo financiero otorgado.

A Fresenius Kabi Deutschland GmbH por el financiamiento concedido para la ejecución de esta investigación.

Al comité revisor por enriquecer este trabajo gracias a sus observaciones.

A todos los investigadores de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, quienes de alguna manera contribuyeron para la realización de este proyecto, especialmente al laboratorio de Bioquímica y Bromatología.

A todos mis amigos y compañeros, con quienes tuve la oportunidad de compartir muy gratos momentos, gracias por todo el apoyo.

A mi familia, gracias por siempre estar para mí.

No Copiar

A mi familia.

RESUMEN

Rios Morales, Silvia Norieth. M. en C. Instituto Tecnológico de Veracruz. Noviembre 2016. "Producción y caracterización parcial de hidrolizados de proteínas de yema de huevo libre de lecitina". Asesores: Dra. Beatriz Torrestiana Sánchez. Dra. Rosa María Oliart Ros. Dr. Edmundo Brito de la Fuente.

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) el huevo es reconocido por ser uno de los alimentos más nutritivos de la naturaleza, aporta proteínas, vitaminas y minerales en cantidades significativas. El huevo contiene un 63% de lípidos (base seca), que se concentran en la yema. Dentro de estos es remarcable el alto contenido de fosfolípidos y la presencia de lecitina. Actualmente la empresa Fresenius Kabi Deutschland, GmbH, obtiene lecitina a partir de la yema de huevo, y genera un subproducto con un alto contenido de proteínas que es vendido a bajos costos. Este subproducto (yema de huevo libre de lecitina) podría ser aprovechado mediante hidrólisis enzimática para la elaboración de hidrolizados que pueden ser empleados en la industria alimentaria o farmacéutica.

La Alcalasa 2.4L ha sido empleada en la hidrólisis de diferentes proteínas a distintas concentraciones de sustrato ($\leq 13\%$ w/v) y condiciones de operación. Sin embargo, no existen estudios sobre el efecto de las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción sobre el grado de hidrólisis y las propiedades funcionales de los hidrolizados de proteínas de yema de huevo.

El objetivo de esta investigación fue establecer condiciones para producir, fraccionar y caracterizar parcialmente los hidrolizados de proteínas de yema de huevo libre de lecitina. Para esto se llevó a cabo el estudio del efecto del pH, la temperatura (T) y la relación enzima/proteína (E/S) sobre el grado de hidrólisis (%). Posteriormente los hidrolizados fueron fraccionados utilizando membranas de 10, 5 y 1 kDa y las fracciones obtenidas se caracterizaron en términos del contenido de proteína soluble, estabilidad térmica y rango de peso molecular.

Los resultados indicaron un efecto significativo ($p < 0.05$) del pH, la temperatura y la relación enzima/sustrato sobre el grado de hidrólisis (%) en el intervalo estudiado. Además, se observó que el grado de hidrólisis disminuyó al aumentar la concentración de proteína hasta 20%. Esto debido a problemas de mezclado (gradientes de pH y T) observados al inicio de la reacción y/o a una inhibición por sustrato. También se observó que el grado de hidrólisis no se afectó cuando la concentración de grasa en la mezcla inicial de hidrólisis fue $\leq 10\%$. Sin embargo, la concentración de proteína soluble, la estabilidad térmica de los hidrolizados y el flux de permeado de la membrana de corte de peso molecular de 10 kDa disminuyeron cuando la reacción se llevó a cabo en dispersiones de proteína con 10% de grasa.

La se ajustó al modelo de Weibull a las cinéticas de hidrólisis y se obtuvo un valor de $R \geq 0.95$ esto permitió estimar el grado de hidrólisis máximo en la reacción bajo las condiciones de operación estudiadas. El análisis de las fracciones del hidrolizado obtenidas por ultrafiltración indicó que 69% de los péptidos obtenidos bajo las mejores condiciones de hidrólisis establecidas poseen un peso molecular menor a 1 kDa.

No Copiar

ABSTRACT

Rios Morales, Silvia Norieth. M. en C. Technological Institute of Veracruz. November 2016. "Production and partial characterization of hydrolysates from lecithin free egg yolk protein". Advisers: Ph.D. Beatriz Torrestiana Sánchez, Ph.D. Rosa María Oliart Ros, Ph.D. Edmundo Brito de la Fuente.

The FAO recognized egg as one of the most nutritious foods of nature. It provides protein, vitamins and minerals in significant quantities. Egg contains 63% lipids (dry basis) concentrated mainly in the yolk, in which the high content of phospholipids and the presence of lecithin is remarkable.

Currently the company Fresenius Kabi Deutschland GmbH, obtains lecithin from egg yolk and generates a sub-product (lecithin free egg yolk) with a high protein content that is sold at low costs. This lecithin free egg yolk can be transformed by enzymatic hydrolysis to produce hydrolysates which might be used in the food or pharmaceutical industries. Otherwise, the enzyme Alcalase 2.4L has been used to hydrolyze different proteins under different substrate concentrations ($\leq 13\%$ w/v) and operating conditions. However, no studies have been conducted to evaluate the effect of conditions under which the reaction takes place on the degree of hydrolysis and the functional properties of hydrolysates from egg yolk proteins.

The objective of this research was to establish conditions to produce, fractionate and partially characterize the hydrolysates from lecithin free egg yolk protein. The effect of pH, temperature (T) and enzyme/protein ratio (E/S) was evaluated in terms of the degree of hydrolysis (%). Subsequently hydrolysates were fractionated by using 10, 5 and 1 kDa membranes and the fractions obtained were characterized in terms of soluble protein, thermal stability and range of molecular weight. The obtained results indicated a significant effect ($p < 0.05$) of pH, T and E/S ratio on the degree of hydrolysis (%) in the range tested. It was also observed that the degree of hydrolysis decreased when increasing the protein concentration up to 20%. This, might be attribute to the mixing problems (pH and T gradients) observed at the beginning of the reaction and/or to substrate inhibition. It was also observed that the degree of hydrolysis was not affected by up to 10% fat concentration in the initial mixture of hydrolysis. However, the soluble protein concentration, the thermal stability of hydrolysates and the permeate flux of the 10 kDa membrane decreased when the reaction was carried out in protein dispersions with 10% fat. The kinetics of hydrolysis was fit to the Weibull model with a value of $R \geq 0.95$ and this allowed estimating the maximum degree of hydrolysis under the studied reaction operating conditions. The analysis of the hydrolysate fractions obtained by ultrafiltration indicated that 69% of peptides obtained under the best hydrolysis conditions have a molecular weight less than 1 kDa.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas.....	14
2.1.2. Hidrólisis enzimática de proteínas con Alcalasa 2.4L.....	15
2.1.3. Hidrólisis enzimática de proteínas de yema de huevo.....	17
2.2. Condiciones de operación en reacciones de hidrólisis.....	22
2.3. Propiedades de los hidrolizados.....	23
3. SÍNTESIS DE ANTECEDENTES	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general:	27
4.2 Objetivos específicos:.....	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
5.1. Estrategia Experimental	28
5.2. Extracción de grasa de la proteína de yema de huevo libre de lecitina.....	29
5.3. Reacción de hidrólisis.....	30
5.4. Fraccionamiento y purificación parcial de los hidrolizados.....	32
5.5. Caracterización de los hidrolizados.....	33
5.5.1. Solubilidad.....	33
5.5.3. Estabilidad térmica.	34
5.5.4. Rango de peso molecular.....	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1. Extracción de grasa al sub-producto de proteína de yema de huevo libre de lecitina.	35
6.2. Efecto de las variables de operación en el grado de hidrólisis.....	35
6.2.1. Efecto de la temperatura sobre el grado de hidrólisis.....	36
6.2.2. Efecto del pH sobre el grado de hidrólisis.....	37

6.2.3. Efecto de la relación enzima/sustrato sobre el grado de hidrólisis.	38
6.2.4. Efecto de la concentración inicial de proteína sobre el grado de hidrólisis.....	41
6.2.5. Ajuste del modelo de Weibull a las cinéticas de reacción.	43
6.2.6. Efecto del contenido de grasa sobre el grado de hidrólisis.	46
6.2.7. Fraccionamiento del hidrolizado de proteínas de yema de huevo libre de lecitina empleando un sistema de flujo pistón.	48
6.2.8. Efecto de la concentración de grasa sobre el desempeño de las membranas durante el fraccionamiento	49
6.3. Caracterización de los hidrolizados de proteína de yema de huevo libre de lecitina.....	51
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA	57

[B1][u2]

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1 Composición química de los componentes del huevo (adaptado de Shenstone, 1968 y Sauveur,1988)	18
TABLA 2.2. Composición química de la yema de huevo.....	19
TABLA 2.3. Producción de hidrolizados a partir de la proteína de la yema de huevo	21
TABLA 5.1. Niveles de los factores a estudiar en la reacción de hidrólisis	30
TABLA 6.1. Porcentaje de grasa extraída con diferentes métodos de extracción, solventes y temperatura.	35
TABLA 6.2. Grado máximo de hidrólisis (DHm) y tiempo medio de grado de hidrólisis (MDHT) obtenidos del ajuste del modelo de Weibull a las cinéticas de reacción con diferente relación enzima/sustrato y concentración de proteínas, 10% grasa.....	45
TABLA 6.3.Rango de peso molecular de las fracciones obtenidas por ultrafiltración empleando membranas de celulosa regenerada de 10, 5 y 1 kDa. 10% Grasa.....	54
TABLA 6.4. Rango de peso molecular de las fracciones obtenidas por ultrafiltración empleando membranas de celulosa regenerada de 10, 5 y 1 kDa. 0% Grasa.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Mecanismo catalítico de una proteasa.....	14
Figura 5.1. Estrategia experimental.....	28
Figura 5.2. Montaje experimental para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de las proteínas de yema de huevo libre de lecitina.....	30
Figura 5.3. Esquema general de ultrafiltración utilizado para el fraccionamiento de los hidrolizados de proteína de yema de huevo.....	33
Figura 6.1. Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de hidrólisis a pH 8 y E/S 0.07 AU/g de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa. Concentración de proteína: 5% p/v.....	36
Figura 6.2. Efecto del pH sobre el porcentaje de hidrólisis a T 55 °C y E/S=0.07 AU/g de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa. Concentración de proteína: 5% p/v.....	38
Figura 6.3. Efecto de E/S sobre el porcentaje de hidrólisis a T 55 °C y pH 8 de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa. Concentración de proteína: 5% p/v.....	39
Figura 6.4. Efecto de E/S sobre el porcentaje de hidrólisis a T 55 °C y pH 8 de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa. Concentración de proteína: 5% p/v.....	40
Figura 6.5. Efecto de la concentración de proteína sobre el grado de hidrólisis. T 55 °C y pH 8 de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa.....	42
Figura 6.6. Mezcla inicial para hidrólisis al 20% de proteína.....	42
Figura 6.7. Mezcla inicial para hidrólisis al 30% de proteína.....	43
Figura 6.8. Ajuste del modelo de Weibull a las cinéticas de hidrólisis realizadas a diferentes valores de E/S. Las condiciones de temperatura (55 °C), pH (8.0), concentración de proteína (5% w/v) y contenido de grasa (10% w/v) se mantuvieron constantes.....	44

Figura 6.9. Perfiles de Flux de permeado obtenidos durante el fraccionamiento de los hidrolizados empleando membranas de celulosa regenerada de 10, 5 y 1 kDa. Temperatura 25 °C.....	47
Figura 6.10. Recuperación del flux de agua después de la limpieza de la membranda de ultrafiltración. Membrana celulosa regenerada 10 kDa, presión 1 bar.	48
Figura 6.11. Efecto de la concentración de grasa sobre el flux de permeado. Membrana de 10, 5 y 1 kDa, con y sin grasa.	49
Figura 6.12. Fracción del hidrolizado obtenido con membranas de 1 kDa a partir de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 0 y 10% de grasa.	50
Figura 6.13. Efecto de la concentración de grasa sobre el contenido de proteína soluble de los hidrolizados de proteína de yema de huevo libre de lecitina.....	51
Figura 6.14. Efecto de la concentración de grasa sobre el contenido de proteína soluble de los hidrolizados de proteína de yema de huevo libre de lecitina.....	52
Figura 6.15. Estabilidad térmica de los hidrolizados obtenidos a partir de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10 y 0% de grasa.....	53

1. INTRODUCCIÓN

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) el huevo es uno de los alimentos más nutritivos de la naturaleza. Aporta proteínas, vitaminas y minerales en cantidades significativas, su alto contenido de proteínas lo convierte en una buena fuente de aminoácidos y péptidos de gran interés industrial.

El huevo posee una gran variedad de propiedades funcionales las cuales son necesarias para llevar a cabo la fabricación de diversos alimentos, su uso se ha extendido a industrias de confitería, pastelería, panadería, helados, platos preparados, productos cosméticos, industria farmacéutica, mayonesas y salsas, entre otros.

Está compuesto por la cáscara, la clara y la yema, en la yema se encuentran la mayor cantidad de fosfolípidos, donde es remarcable el alto contenido de lecitina ($\approx 69\%$), la cual es de gran importancia para muchas industrias. La lecitina es una sustancia que posee una gran capacidad emulsionante, y se usa principalmente como aditivo en la fabricación de alimentos. También tiene diversas aplicaciones como humectante, se utiliza en formulaciones infantiles y en la industria farmacéutica en emulsiones para nutrición parenteral.

Actualmente, la empresa Fresenius Kabi Deutschland obtiene lecitina a partir de la yema de huevo que utiliza para la elaboración de emulsiones nutricionales. Del proceso de obtención de este fosfolípido (lecitina) se genera un subproducto de yema de huevo libre de lecitina, que en la mayoría de los casos es vendido a bajos costos, desperdiciando su alto valor nutritivo.

Uno de los procesos mayormente utilizados para el aprovechamiento de sub-productos de proteína es la hidrólisis enzimática. Ésta se ha aplicado para mejorar y renovar las propiedades funcionales y nutricionales de las proteínas de los alimentos (Muzaiifa *et al.*, 2012)

Los hidrolizados de proteínas tienen una amplia aplicación en la industria alimentaria, esto se debe principalmente a que durante el proceso de hidrólisis las características funcionales se potencializan. Dentro de éstas, las más importantes son la alta solubilidad, la baja viscosidad, mayor capacidad de agitación, dispersión, lo que les confiere mayores ventajas respecto a las proteínas originales (Demirhan *et al.*, 2011).

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados son[B3] como fuente de péptidos y aminoácidos en la formulación de dietas enterales para alimentación infantil y/o de adultos enfermos. Estas dietas 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 (Muzaiifa *et al.*, 2012)

Para llevar a cabo el proceso de hidrólisis se ha reportado el uso de diversas enzimas capaces de romper los enlaces peptídicos de las proteínas. Dentro de éstas se destaca la Alcalasa como una alternativa para la obtención de hidrolizados con buenas propiedades funcionales a partir de diversas fuentes de proteínas (Chabanon *et al.*, 2007; Valencia *et al.*, 2014; Quist *et al.*, 2009; Klompong *et al.*, 2007)

El producto obtenido después del proceso de hidrólisis enzimática puede ser separado y concentrado utilizando técnicas de filtración con membranas, de esta forma se puede incrementar el valor de dichos hidrolizados.

El objetivo de esta investigación fue establecer condiciones para producir, fraccionar y caracterizar parcialmente hidrolizados de proteínas de yema de huevo libre de lecitina obtenidos con Alcalasa 2.4L

2. ANTECEDENTES

2.1. Hidrólisis enzimática de proteínas.

La hidrólisis enzimática es un proceso mediante el cual los enlaces peptídicos de las proteínas son escindidos por acción de enzimas, y como resultado se obtiene un gran número de especies peptídicas. (Lindley 1954), propone un mecanismo de hidrólisis que consta que tres pasos consecutivos. En el primer paso, se forma un complejo enzima-sustrato, posteriormente existe una ruptura del enlace amídico, lo que da como resultado la liberación de un péptido, finalmente ocurre la separación del péptido de la enzima, después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. En la Figura 1.1 se presenta de manera esquemática el mecanismo catalítico de una proteasa.



FIGURA 2.1 Mecanismo catalítico de una proteasa. (Benítez et al., 2008)

2.1.1. Medida del grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis, que se define como la relación entre el número de enlaces peptídicos rotos y el número total de enlaces peptídicos en la proteína, es el criterio cuantitativo para la medida del avance de la reacción proteolítica (Spellman *et al.*, 2003).

Existen diferentes métodos para la determinación del grado de hidrólisis, dentro de los que se destaca la valoración del protón o técnica del pH-estato. La hidrólisis de proteínas transcurre con liberación o consumo de protones, por lo tanto, el control del

proceso puede llevarse a cabo por la medida del consumo de agente neutralizante necesario para mantener constante el pH (Adler-Nissen, 2002)

2.1.2. Hidrólisis enzimática de proteínas con Alcalasa 2.4L

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores de reacciones con diversos sustratos, dentro de los que se destacan las proteínas, descomponiéndolas en unidades más pequeñas. Las enzimas actúan en condiciones especiales de temperatura, pH y concentración de sustrato.

Las proteasas son las enzimas responsables de la hidrólisis enzimática de las proteínas. Estas enzimas pueden ser clasificadas de acuerdo a su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o en base a su sitio catalítico (serínproteasas, cisteínproteasas, aspartato proteasas) (Rao *et al.*, 1998)

Las endoproteasas hidrolizan enlaces amídicos dentro de la cadena de la proteína. Las exoproteasas, por el contrario, eliminan aminoácidos terminales de las proteínas o péptidos. La naturaleza del centro catalítico de las proteasas difiere en función de los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato (Benítez *et al.*, 2008).

La proteasa Alcalasa es una serin proteasa de origen bacteriano que actúa sobre aminoácidos aromáticos principalmente, producida por fermentación de una cepa de *Bacillus licheniformis*. Las condiciones óptimas para la Alcalasa son temperaturas entre 55 y 77 °C, dependiendo del tipo de sustrato, y valores de pH entre 6.5 y 8.5. La actividad declarada para para la Alcalasa 2.4L es 2.4 AU/g (Novo Nordisk, 1998).

Se han realizado numerosos estudios donde se utiliza esta enzima para la obtención de péptidos de diversas fuentes, dentro de los que se destaca el realizado por (Liu *et al.*, 2015) quienes aislaron e identificaron nuevos péptidos antioxidantes a partir de proteínas de clara de huevo hidrolizadas con Alcalasa [B4][u5]. También evaluaron la actividad antioxidante de los mismos.

La enzima Alcalasa también se ha usado para la hidrólisis de proteína de pescado, Valencia *et al.*, 2014 hidrolizaron proteína del músculo de pescado con Alcalasa 2.4L a un pH 8 y una relación enzima/sustrato de 0.12 AU/g. Estos autores variaron temperatura y la concentración inicial de proteína, con el fin de identificar los mecanismos implicados en la hidrólisis, encontrando que la inhibición por producto podría explicar satisfactoriamente la curva de la hidrólisis. El grado de hidrólisis máximo reportado por Valencia *et al.*, 2014 fue de 20%.

(Guérard *et al.*, 2001) hidrolizaron proteína de pescado con Alcalasa 2.4L a pH 8, 50 °C y usaron una relación enzima/sustrato (E/S) de 0.085 UA/g de proteína. También variaron la concentración de proteína de 0.2 a 3% y encontraron que la concentración de enlaces hidrolizables disponibles fue uno de los principales factores que controlaron la velocidad de hidrólisis. El grado de hidrólisis máximo reportado fue de 23%.

(Klompong *et al.*, 2007) también hidrolizaron proteína de pescado usando Alcalasa 2.4L y flavourzyme. La concentración de proteína usada fue de 4.7% w/w, la relación E/S fue 0.25 AU/g, el pH 8.5 y temperatura 60 °C. Estos autores reportaron que la hidrólisis aumentó la solubilidad de las proteínas y que la actividad antioxidante dependió del grado de hidrólisis y [del tipo de enzima[B6]][u7]. Para Alcalasa 2.4L se reportó 40% de grado de hidrólisis.

Por otro lado, (Chabanon *et al.*, 2007) realizaron la hidrólisis enzimática de proteínas de semilla de canola con Alcalasa 2.4L variando la concentración de proteína de 0.5 a 13% w/v. Las condiciones de temperatura, pH y relación enzima/sustrato fueron 50 °C, 8 y 0.45 AU/g, respectivamente. Ellos caracterizaron las propiedades físico-químicas de los hidrolizados obtenidos durante el proceso, y reportaron un grado de hidrólisis máximo de 22%.

La proteína de leche de vaca fue hidrolizada con Alcalasa 2.4FG con el fin de determinar los efectos del pH, la temperatura y la relación enzima/sustrato sobre la antigenicidad de los hidrolizados (Zheng *et al.*, 2008). (Quist *et al.*, 2009) hidrolizaron proteína de cacahuate a pH 7.5, 60 °C, una relación E/S=0.3 AU/g y una concentración de proteína de 1.23%. Ellos encontraron que el tratamiento de la materia prima afecta

las propiedades de los hidrolizados, el grado de hidrólisis máximo reportado fue de 23%. Las proteínas de suero también se han hidrolizado con Alcalasa 2.4L y se han reportado propiedades funcionales de los hidrolizados (Severin & Xia 2006)

(Park *et al.*, 2001) hidrolizaron proteína de huevo libre de lecitina con la ayuda de Alcalasa 0.6L. Los hidrolizados se fraccionaron y obtuvieron tres tipos de permeados a los cuales se les determinó la capacidad antioxidante de cada fracción. Por otro lado, (Zhang *et al.*, 2014) hidrolizaron proteína de papa dulce con Alcalasa 2.4L, identificaron péptidos antioxidantes y determinaron actividades eliminadoras de OH^- de los péptidos obtenidos.

Como se ha mencionado anteriormente, existen numerosos trabajos donde se reporta el uso de la Alcalasa 2.4L para la producción de hidrolizados de diversas fuentes de proteína (dentro de la que se destaca la proteína de pescado), sin embargo, las condiciones de operación reportadas son diferentes (rango de pH 7-8.5; rango de temperatura 40-60; rango concentración de proteína inicial 1.23- 13%), dependiendo del tipo de sustrato con el cual se trabaja.

2.1.3. Hidrólisis enzimática de proteínas de yema de huevo.

El huevo es un alimento con una composición excepcional de nutrientes, está constituido por albumen, cáscara, membrana y yema. En la Tabla 2.1 se presenta la composición química de los componentes del huevo.

TABLA 2.1. Composición química de los componentes del huevo (adaptado de Shenstone, 1968 y Sauveur,1988)

Componente químico	Cáscara (%)	Albumen (%)	Yema (%)	Total comestible
Agua	1.6	87-89	46.5	74.0-75.5
Proteínas	3.3	9.5-11.5	16.0-17.0	12.0-12.8
Lípidos	-	-	33.0-34.0	11.8-12.3
Saturados	-	-	11.2-11.7	4.3-4.5
Insaturados	-	-	18.2-19.0	6.7-7.0
Colesterol	-	-	1.31-1.38	0.47-0.50
Glúcidos	-	0.4-0.5	0.15-0.25	0.3-0.4
Cenizas	95.1	0.5-0.7	1.1-1.6	0.8-1.0
Calorías	-	40-55	380-400	160-180

En el huevo se concentra la proteína considerada como la de mayor valor biológico (contiene los aminoácidos esenciales para el organismo), respecto a otros productos comestibles de origen animal. El albumen tiene características nutricionales y funcionales específicas debido a las proteínas que contiene. Dentro de estas, destacan la ovoalbúmina (54%) y ovomucina (11%), las cuales son responsables de la consistencia del albumen, y la lisozima (3.4%) por sus propiedades antibacterianas (Laca *et al.*, 2010)

Las propiedades emulsificantes del huevo se deben a la presencia de las lipoproteínas. Estos lípidos se concentran principalmente en la yema, donde también se concentra la mayor cantidad de vitaminas, especialmente las vitaminas liposolubles (A, D3, E Y K), así como los pigmentos carotenoides, que le confieren el color amarillo-anaranjado (Grobas *et al.*, 1996). En la Tabla 2.2 se detalla la composición química de la yema de huevo, donde se muestra el porcentaje total de materia seca, lípidos y fosfolípidos de cada uno de sus componentes.

TABLA 2.2. Composición química de la yema de huevo.[B8][u9]

Componente	% total		
	Materia seca	Lípidos	Fosfolípidos
Lípidos	63.0		
Triglicéridos		63.1	
Fosfolípidos		29.7	
Fosfatidil colina			69.2
Fosfatidil etanolamina			23.9
Fosfatidil serina			2.7
Enfingomielina			1.0
Otros			3.2
Ésteres colesterol		1.3	
Colesterol libre		4.9	
Vitaminas y pigmentos		1.0	
Proteínas	33.0		
Lípidos	4-10		
Fosvitina	5-6		
Vitelina (en H.D.L)	4-15		
Vitelina (en L.D.L)	8-9		
Minerales	2.1		
Vitaminas	1.5		
Glucosa libre	0.4		

En esta tabla se puede ver que el huevo contiene un 63% de lípidos (base seca), que se concentra en la yema. Dentro de estos, es remarcable el alto contenido de los fosfolípidos y se destaca la presencia de fosfatidil colina o lecitina. La lecitina es de gran interés en la industria alimentaria por sus características emulsificantes; también tiene otras aplicaciones como la reducción de la viscosidad (para elaboración de chocolate), humectante (en productos en polvo como el cacao, para evitar la formación

de grumos) e incluso se le atribuyen características antioxidantes ya que puede secuestrar el hierro (Laca *et al.*, 2010).

La lecitina se usa en fórmulas infantiles, debido a que aumenta el contenido de ácido araquidónico y de DHA, imprescindibles para el bebé y se relacionan con el crecimiento, el desarrollo y mejora de la visión y de la función cognitiva. También tiene usos en la industria farmacéutica (fórmulas de nutrición parental) y en cosmética (cremas y champús). Todos los componentes presentes en la yema de huevo tienen características específicas, lo que le confiere sus propiedades funcionales. La yema de huevo tiene compuestos bioactivos de gran interés en industrias médicas y farmacéuticas, cosméticas y biotecnológicas (Laca *et al.*, 2010).

El alto contenido de proteínas en el huevo hace que éste sea una buena fuente de péptidos y aminoácidos y, a pesar que es muy amplio el estudio del proceso de hidrólisis enzimática para proteínas de diversas fuentes, la información para la hidrólisis de proteínas de yema de huevo no es tan amplia. En la Tabla 2.3 se resumen los trabajos reportados en la literatura donde se utiliza yema de huevo como fuente de proteínas para la hidrólisis enzimática. Es importante resaltar que solo en un caso se utiliza un tipo de Alcalasa (0.6L) para catalizar la reacción.

TABLA 2.3. Producción de hidrolizados a partir de la proteína de la yema de huevo

Producción de hidrolizados a partir de la proteína de la yema de huevo.			
Referencia	Objetivos	Enzima	Resultados
(Eckert <i>et al.</i> , 2014)	Evaluar la actividad de inhibición de la ACE (enzima convertidora de angiotensina I) de péptidos hidrolizados de proteína de yema de huevo.	Proteasa aislada de <i>Cucurbita ficifolia</i>	Fracción peptídica <5 kDa mostró alta actividad de inhibición de ACE. Se identificaron 7 péptidos formados por 9 a 18 residuos de amino ácidos
(Orcajo <i>et al.</i> , 2013)	Hidrolizar proteína de yema de huevo y comparar las características de productos enriquecidos con estos hidrolizados	Tripsina [P] 0.4% w/v pH 7.5 T:37 °C	Mayonesa enriquecida con los hidrolizados fue más estable a cambios de temperatura entre 4 y 20 °C y con mejores propiedades reológicas que la mayonesa sin hidrolizados.
(Park <i>et al.</i> , 2001)	Purificación y caracterización de la actividad antioxidante de péptidos a partir de hidrolizados de proteína de yema de huevo.	Alcalasa 0.6L [P] 1% w/v pH: 7 T: 50 °C	Los péptidos obtenidos en los permeados de las membranas de 5 y 1 kDa tuvieron mayor actividad antioxidante que el α -Tocoferol
(Zambrowicz <i>et al.</i> , 2012)	Evaluar las propiedades antioxidantes de hidrolizados de proteína de un sub-producto de yema de huevo	Pepsina porcina tipo A; Tripsina y α -quimotripsina bovina tipo II	El tipo de enzima utilizada fue un factor clave en la determinación de la actividad antioxidante de los hidrolizados de YP. Los hidrolizados obtenidos a partir de endopeptidasas exhibieron mayor capacidad antioxidante.
(Zambrowicz <i>et al.</i> , 2015)	Obtener péptidos con actividad antioxidante, actividad inhibitoria ACE y con propiedades antidiabéticas	Pepsina	Los péptidos obtenidos tuvieron potencial como sustancias naturales y multifuncionales para controlar las enfermedades relacionadas con la dieta.

2.2. Condiciones de operación en reacciones de hidrólisis

El estudio de las variables de operación permite determinar los mejores resultados dentro del proceso, para de esta manera potencializar las características de los productos. En la revisión bibliográfica se encontraron diversas investigaciones dedicadas a la optimización de las variables de operación que influyen en el proceso de hidrólisis enzimática. Por ejemplo, Bhaskar *et al.*, 2008 optimizaron las condiciones de hidrólisis (tiempo, temperatura, pH y relación enzima/sustrato) de proteína de vísceras de pescado. Los resultados obtenidos fueron: 135 min de hidrólisis, 50 °C de temperatura, relación enzima sustrato 1.5% (v/w) y pH= 8.5.

(Castro & Sato 2014), optimizaron la producción de hidrolizados de proteínas de huevo con actividad antioxidante. Las dos variables a optimizar fueron concentración de sustrato y concentración de proteasa. Los resultados obtenidos fueron 3.0% y 20.0 U de proteasa por ml de reacción, respectivamente.

(Yuan *et al.*, 2008), optimizaron la producción de hidrolizados de la proteína *Momordica charantia* L. Var. *Abbreviata* Ser, usando seis diferentes proteasas y encontraron que la Alcalasa 2.4L presentó la mejor capacidad de hidrólisis. Los valores óptimos encontrados para el proceso fueron una relación enzima/sustrato de 2,37%, pH 9.2 y 57°C.

En la investigación realizada por (Guérard *et al.*, 2001) encontraron las mejores condiciones de hidrólisis de temperatura, pH y concentración de Alcalasa 2.4L para obtener hidrolizados con mayor actividad antioxidante a partir de proteína de camarón. Ellos obtuvieron pH 9.7, temperatura 66.2 °C y concentración de enzima 68.1 AU/ kg proteína cruda.

(Diniz & Martin 1996) hidrolizaron proteína del músculo de pescado (*dogfish*) con Alcalasa 2.4L y los valores óptimos encontrados fueron: pH 8.3, temperatura 53.6 °C, relación enzima/sustrato 3,6% (w/w). (Normah *et al.*, 2004) también optimizaron las condiciones de hidrólisis de proteína de pescado usando Alcalasa 2.4L y reportaron como óptimos un 2% de relación enzima/sustrato, pH= 8.5 y temperatura de 60 °C.

Es evidente, a partir de estos trabajos, que las condiciones de hidrólisis reportadas para la Alcalasa 2.4 L han sido diferentes, lo cual sugiere que la enzima es capaz de hidrolizar proteínas de distintas fuentes en un amplio rango de condiciones de pH, temperatura y de concentración de sustrato. Además, el tipo de sustrato y el medio de reacción (presencia de otros componentes en el sustrato) pueden influenciar la eficiencia de hidrólisis de la enzima. Por lo que es importante realizar un estudio donde se determinen las condiciones óptimas del proceso de hidrólisis de yema de huevo libre de lecitina usando Alcalasa 2.4L.

2.3. Propiedades de los hidrolizados

2.3.1. Solubilidad

La solubilidad es una de las características de mayor interés de los péptidos; es una propiedad funcional que se utiliza como parámetro para determinar las posibles aplicaciones en diferentes industrias. Ésta ha sido ampliamente estudiada y reportada en la literatura (Chabanon *et al.*, 2007; Klompong *et al.*, 2007; Severin & Xia 2006; Castro & Sato 2014). Generalmente se requiere que las proteínas tengan una alta solubilidad para promover una buena emulsión, espuma, gelificación y otras características.

Son muchos los factores que tienen influencia sobre la solubilidad, por ejemplo, la composición de amino ácidos, la estructura de la proteína (nativa o desnaturalizada) y las condiciones del medio, tales como: el pH, la concentración de sal y la temperatura (Sousa *et al.*, 2006). Según (Chabanon *et al.*, 2007), la solubilidad es una propiedad física importante en los hidrolizados, ya que la baja solubilidad puede generar una sensación en la boca de un producto arenoso y proporciona un aspecto poco atractivo. En general, la solubilidad de una proteína aumenta conforme aumenta el grado de hidrólisis.

2.3.2. Peso molecular

El tamaño molecular de los péptidos es uno de los parámetros más importantes que permite describir características de los hidrolizados, dentro de las que se destaca la capacidad antigénica de estos. Los pesos moleculares obtenidos de la hidrólisis de proteína de yema de huevo son diversos.

(Park *et al.*, 2001) obtuvo tres fracciones procedentes de membranas de 10, 5 y 1 kDa y comparó la actividad antioxidante con el α -tocoferol. Los hidrolizados de 10 K tienen una distribución de tamaño de 12 a 6.5 kDa. La distribución de tamaño de 5 K fue localizada desde 5.5 y 1 kDa y el hidrolizado de 1 K muestra tres picos, 900, 700 y 350. (Zambrowicz *et al.*, 2015) secuenció los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de proteína de yema de huevo libre de lecitina, encontrando pesos en el rango de 1678 y 404 Da. Además comprobó actividad antioxidante.

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una técnica ampliamente utilizada para la separación de proteínas, dentro de las características más sobresalientes está la porosidad controlable, elasticidad, transparencia y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos. Esta técnica permite estimar el peso molecular de una proteína, comparando su movilidad electroforética con la de una proteína de peso molecular conocido (Chrambach & Rodbard 1971).

La cromatografía de filtración en gel es una técnica que aprovecha la diferencia de tamaños moleculares para la separación de las moléculas, de esta manera es posible la purificación de sustancias de interés. Esta técnica es sencilla y eficaz en la resolución de mezclas complejas de macromoléculas (Zambrowicz *et al.*, 2015). También se ha usado cromatografía en fase reversa para la separación, identificación y purificación de péptidos obtenidos a partir de hidrólisis enzimática.

2.3.3. Estabilidad térmica.

La desnaturalización de las proteínas está muy relacionada con la temperatura del sistema. Las proteínas altamente desnaturalizadas tienden a agregarse y a formar

precipitados. La solubilidad de las proteínas se incrementa con el aumento de la temperatura, sin embargo, cuando la temperatura aumenta considerablemente por encima del intervalo de máxima solubilidad, el efecto se hace inverso y la proteína se desnaturaliza con su consecuente precipitación (Giese, 1994).

No Copiar

3. SÍNTESIS DE ANTECEDENTES

La proteína de yema de huevo obtenida como subproducto del proceso de extracción de lecitina es una materia prima de bajo costo que puede ser utilizada para producir hidrolizados.

La Alcalasa 2.4L ha sido empleada en la hidrólisis de proteínas a diferentes concentraciones ($\leq 13\%$ w/v) y condiciones de operación, sin embargo, no existen estudios del efecto de las condiciones en las que se lleva a cabo la reacción sobre el grado de hidrólisis y las propiedades funcionales de hidrolizados de proteínas de yema de huevo.

La alcalasa 2.4L es una enzima que ha sido usada en el proceso de hidrólisis enzimática de diversas proteínas, debido a que mejora las propiedades funcionales de los hidrolizados, además que tiene una amplia especificidad, puede hidrolizar la mayoría de enlaces peptídicos dentro de una molécula de proteína.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Establecer las condiciones para producir, fraccionar y caracterizar parcialmente los hidrolizados de proteínas de yema de huevo libre de lecitina.

4.2 Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de las condiciones de reacción (relación enzima/sustrato, pH y temperatura) sobre el grado de hidrólisis de las proteínas de yema de huevo libre de lecitina usando la enzima Alcalasa 2.4 L.
- Separar y fraccionar los péptidos del hidrolizado empleando membranas de ultrafiltración.
- Caracterizar los hidrolizados obtenidos en términos de proteína soluble, estabilidad térmica y rango de peso molecular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Estrategia Experimental

El trabajo experimental se dividió en tres etapas (Figura. 5.1). En la primera etapa se evaluó el efecto de las condiciones de pH, temperatura y relación enzima/sustrato sobre el grado de hidrólisis. Cada variable tuvo tres niveles y el estudio se realizó evaluando el efecto de una variable a la vez. La segunda etapa consistió en el fraccionamiento y purificación parcial de los péptidos por ultrafiltración (UF), ésta se llevó a cabo en una celda agitada (Millipore) con membranas de celulosa regenerada de corte de peso molecular (MWCO) de 10, 5 y 1 kDa. Finalmente, en la tercera etapa se realizó la caracterización de los hidrolizados en términos de contenido de proteína soluble, estabilidad térmica y se determinó el rango de peso molecular de las fracciones separadas por ultrafiltración.

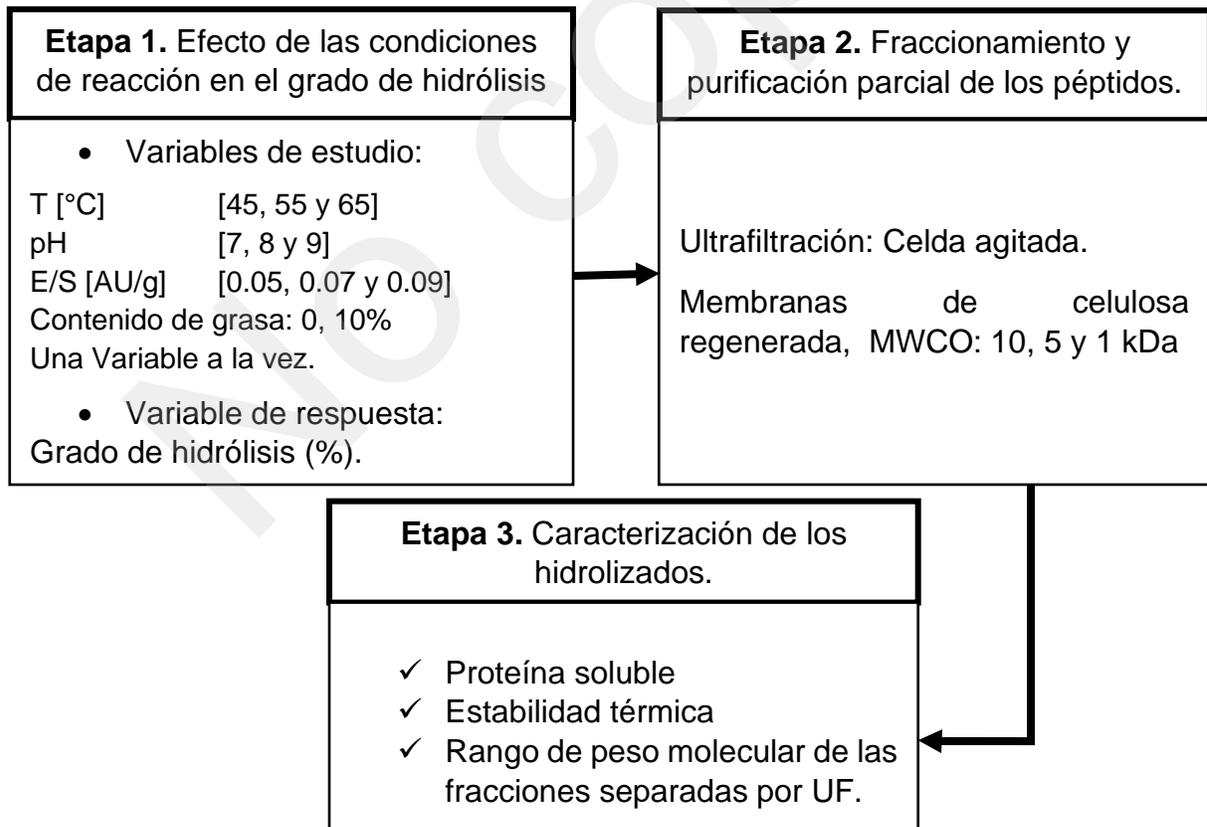


FIGURA 5.1 Estrategia experimental.

5.2. Extracción de grasa de la proteína de yema de huevo libre de lecitina

Se llevaron a cabo experimentos preliminares para seleccionar el solvente más adecuado para la extracción de grasa de la materia prima. Los solventes seleccionados fueron acetona (pureza >98%) y hexano (99% de pureza) en base a la literatura (Wang *et al.*, 2014; Nielsen 2007).

La relación materia prima:solvente evaluada fue de 1:4. El protocolo de extracción fue similar al reportado por (Wang *et al.*, 2014). También se probaron diferentes temperaturas para ver el efecto de esta variable sobre el porcentaje de extracción de grasa, las temperaturas probadas fueron 30 y 40 °C

El tiempo total de extracción fue de 30 min dividido en tres etapas, la temperatura a la cual se llevó a cabo el proceso fue de 30°C. En la primera etapa se adicionó el 50% del volumen total del solvente, después de 10 min de extracción se dejó reposar durante dos minutos. En la segunda y tercera etapa se agregó el 25% del volumen total con intervalos de tiempo de 10 min. El proceso de extracción se realizó con agitación constante, mediante una barra magnética (la agitación fue la necesaria para homogenizar la muestra), en un matraz con rosca (con el fin de evitar la evaporación del solvente).

El desgrasado total de la materia prima (hasta 0% de grasa) se realizó por el método de extracción Soxhlet utilizando hexano (99% de pureza) como solvente, el solvente fue elegido de acuerdo con los resultados del experimento anterior. El protocolo de extracción fue de acuerdo al establecido por James (1999), el tiempo de extracción fue de 12 horas. El porcentaje de grasa extraída se determinó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{ grasa extraída} = \frac{\text{Peso Grasa extraída}}{\text{Peso de muestra}} 100$$

5.3. Reacción de hidrólisis

En la Tabla 5.1 se presentan los niveles de los factores estudiados en la reacción de hidrólisis. Los valores se mantuvieron constantes en el punto central de cada nivel.

TABLA 5.1. Niveles de los factores a estudiar en la reacción de hidrólisis

<i>Factores</i>	<i>Niveles</i>		
T (°C)	45	55	65
pH	7.0	8.0	9.0
E/S (AU/g)	0.05	0.07	0.09

La hidrólisis enzimática se llevó a cabo usando un reactor de vidrio enchaquetado de 100 mL (Figura. 5.2). La evolución de la reacción de hidrólisis se determinó por el método pH-Stat (Sección 5.3.1). El control de pH durante la reacción se realizó usando un titulador Titroline 7000, y la temperatura se mantuvo constante por medio de un baño termostático (Julabo, F12). La materia prima utilizada para llevar a cabo la hidrólisis enzimática fue la obtenida después del proceso de extracción de grasa.

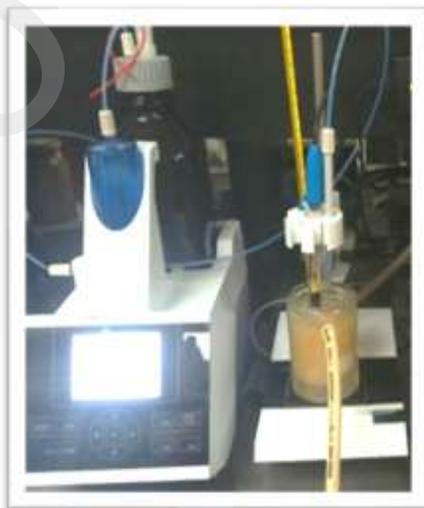


FIGURA 5.2. Montaje experimental para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de las proteínas de yema de huevo libre de lecitina.

Se disolvió la cantidad necesaria de materia prima para fijar la concentración de proteína a probar y se dispersó en 80 mL de amortiguador de fosfato de sodio [0.1 M] ajustado al pH de operación. La agitación se realizó usando una barra magnética. La dispersión se calentó en el reactor a la temperatura requerida, y se agregó la enzima Alcalasa 2.4L a la concentración necesaria para cada relación enzima/sustrato probada. Se tomaron muestras a diferentes tiempos para evaluar el curso de la reacción y al finalizar, la mezcla fue calentada hasta 90 °C durante 10 minutos para la desactivación de la enzima. Los hidrolizados fueron congelados y almacenados para su posterior análisis.

5.3.1. Grado de hidrólisis.

El grado de hidrólisis se determinó por el método pH-Stat (Spellman *et al.*, 2003), mediante el cual se estima la relación del número de enlaces peptídicos rotos durante la reacción respecto al total de enlaces peptídicos presentes en el sustrato usando la siguiente relación:

$$DH (\%) = \frac{BN_B}{\alpha M_p h_{hot}} 100$$

Donde B es la cantidad de base usada para mantener el pH constante. La base utilizada en este trabajo fue NaOH a 2N (Klompong *et al.*, 2007). N_B es la molaridad de la base, α es el grado de disociación promedio de enlaces amino (NH_2), M_p es la masa de la proteína; h_{hot} es el número total de enlaces peptídicos en la proteína. El de grado de disociación promedio de enlaces NH_2 se calculó mediante la siguiente relación:

$$\alpha = \frac{10^{(\text{pH}-\text{pK})}}{1 + 10^{(\text{pH}-\text{pK})}}$$

Donde pK es el valor de disociación de los grupos $\alpha - \text{NH}_2$ liberados durante la hidrólisis. Este valor varía significativamente con la temperatura, pero es relativamente

independiente del sustrato. El pK se calculó mediante el método de Steinhardt y Beychock (1964).

$$pK = 7.8 + \frac{298 - T}{298T} * 240 \quad T \text{ kelvin}$$

Finalmente el h_{hot} puede ser calculado a partir de análisis de aminoácidos mediante la suma de los micromoles de cada aminoácido individual por gramo de proteína, se tomó como 8 g eq/ Kg proteína, ya que para la mayoría de las proteínas el promedio de peso molecular de los aminoácidos es aproximadamente 125 g/mol (Orcajo *et al.*, 2013).

5.4. Fraccionamiento y purificación parcial de los hidrolizados.

Los hidrolizados se ultrafiltraron usando membranas de celulosa regenerada (marca Millipore) de corte de peso molecular (MWCO) de 10, 5 y 1 kDa. Las membranas utilizadas fueron modificadas para disminuir los fenómenos de adsorción sobre la superficie de las mismas usando el método reportado Nyström y Järvinen (1991), el cual consiste en someter a las membranas a radiación ultravioleta. Una membrana nueva fue colocada en 100 mL de agua desionizada en una cámara con lámpara de UV (254 nm) durante 20 min. A continuación, fue refrigerada a 4 °C durante 12 horas para su posterior uso en los experimentos de ultrafiltración.

La ultrafiltración se realizó en una celda agitada en modo flujo pistón, donde la presión fue regulada mediante una corriente de gas inerte (N₂). El hidrolizado fue primero filtrado con la membrana de 10 kDa (Figura. 5.3). Posteriormente, el permeado de la membrana de 10 kDa se ultrafiltró con una membrana de 5 kDa y el permeado de esta etapa se ultrafiltró usando una membrana de 1 kDa (Figura 5.3).

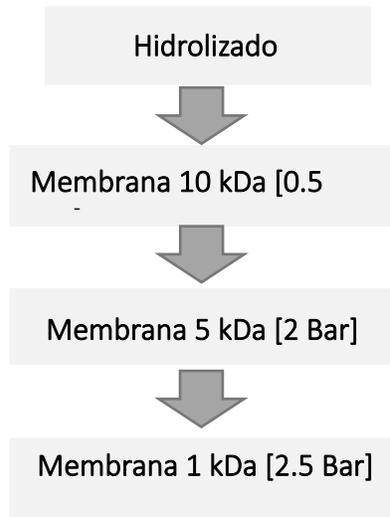


FIGURA 5.3 Esquema general de ultrafiltración utilizado para el fraccionamiento de los hidrolizados de proteína de yema de huevo.

5.5. Caracterización de los hidrolizados

5.5.1. Solubilidad

El contenido de proteína soluble en la muestra se determinó usando el método reportado por (Klompong *et al.*, 2007) con algunas modificaciones. Las muestras de los hidrolizados se centrifugaron a temperatura ambiente a 10 000g por 10 min. El contenido de proteína del sobrenadante se determinó por el método de Kjeldhal y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Proteína\ soluble\ (\%) = \frac{Contenido\ de\ proteína\ en\ el\ sobrenadante}{Contenido\ de\ proteína\ total\ en\ la\ muestra} \cdot 100$$

5.5.2. Determinación de proteína.

El contenido de proteína fue cuantificado para determinar los porcentajes de solubilidad y estabilidad térmica. La cuantificación se llevó a cabo por el método de Kjeldalh. Se tomó 1 g de muestra, y se llevó a cabo la digestión con ácido sulfúrico concentrado y con dos tabletas de catalizador Kjeldalh (sulfato de cobre (II)).

Posteriormente se realizó un lavado con 50 mL de agua destilada, seguido de una destilación. Finalmente, se realizó una titulación con ácido clorhídrico 0.5 N.

El contenido de Nitrógeno total de la muestra se determinó mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ Proteína} = \frac{0.014ABC}{D} 100$$

Donde A es la cantidad de ácido utilizado para titulación (mL), B corresponde a la normalidad del ácido usado, C factor proteína (6.62) y D es el peso de la muestra (g).

5.5.3. Estabilidad térmica. [B10][u11]

La estabilidad térmica se determinó siguiendo el procedimiento establecido por (Castro & Sato 2014). Las muestras de hidrolizados se calentaron a 93 °C durante 1 min. Posteriormente se enfriaron durante 10 min y se centrifugaron a 10 000g por 10 min. Se determinó la concentración de nitrógeno total en el sobrenadante por el método de Kjeldhal y se evaluó la estabilidad usando la siguiente relación.

$$\text{Estabilidad térmica (\%)} = \frac{\text{Contenido de proteína en el sobrenadante después del tratamiento térmico}}{\text{Contenido de proteína total en la muestra antes del tratamiento térmico}} 100$$

5.5.4. Rango de peso molecular

El rango de peso molecular de las fracciones separadas por UF se determinó tomando como base el contenido de proteína total de los permeados y retenidos obtenidos en cada una de las etapas de UF. La concentración de proteína se evaluó por el método de Kjeldahl.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracción de grasa al sub-producto de proteína de yema de huevo libre de lecitina.

En esta etapa se evaluó el efecto del solvente, el proceso de extracción y la temperatura en el porcentaje de grasa extraída. Los resultados se presentan de manera resumida en la Tabla 6.1. Puede verse que el hexano al 99% extrae un mayor contenido de grasa (38%,) comparado con la acetona [B12][u13](pureza > 98%) y el hexano al 96%. También se observó que la temperatura en el rango probado no tuvo un efecto sobre el contenido de grasa extraída.

TABLA 6.1. Porcentaje de grasa extraída con diferentes métodos de extracción, solventes y temperatura.

	Acetona	Hexano 60%	Hexano 99%	T 30 °C	T 40 °C	% Grasa extraída.
Extracción convencional		✓		✓		29.35±1.06
	✓			✓		15.95±0.99
Extracción Soxhlet		✓				48.20±0.97
	✓					36.37±1.91
Extracción por etapas.		✓		✓		33.11±1.03
		✓			✓	30.24±1.04
			✓	✓		38.90±0.04

6.2. Efecto de las variables de operación en el grado de hidrólisis

La concentración inicial de proteína fue de 5% para el estudio de las variables del proceso. El contenido de grasa de la materia prima se mantuvo constante en 10% mediante la extracción por etapas (3 etapas), usando hexano al 99% y una temperatura de 30 °C para estos experimentos.

6.2.1. Efecto de la temperatura sobre el grado de hidrólisis.

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de grado de hidrólisis manteniendo constante el pH (8.0) y la relación enzima/sustrato (0.07 AU/g de proteína). Los resultados señalaron que la temperatura tiene un efecto significativo sobre el grado de hidrólisis (GH), ($p < 0.05$) (Figura. 6.1). Se observa en la Figura. 6.1 que al aumentar la temperatura de 45 °C a 55 °C se produjo un incremento en el porcentaje de grado de hidrólisis. Sin embargo, cuando la temperatura se elevó a 65 °C el porcentaje de grado de hidrólisis disminuyó. Por lo tanto, la temperatura que produjo el mayor porcentaje de grado de hidrólisis ($\approx 37\%$) fue de 55 °C, después de 5 horas de proceso (Figura. 6.1). La velocidad de reacción de las cinéticas de 55 °C y 65 °C fue similar (203 y 188 g/L h, respectivamente) durante los primeros 20 min, pero esta disminuyó de manera importante a 65 °C a lo largo del tiempo de reacción.

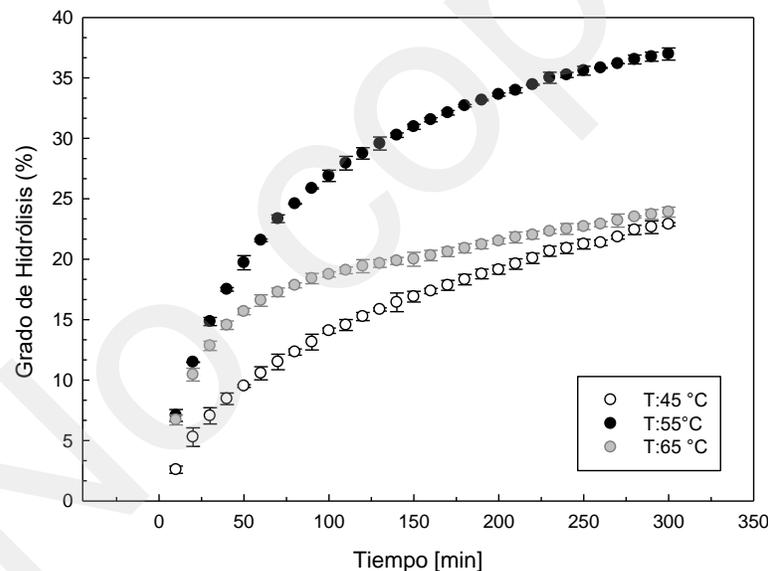


FIGURA 6.1 Efecto de la temperatura sobre el porcentaje de hidrólisis a pH 8 y E/S 0.07 AU/g de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa. Concentración de proteína: 5% p/v.

La tendencia encontrada en el intervalo de temperatura estudiado en esta investigación coincide con los resultados reportados por (Bhaskar *et al.*, 2008), donde la curva que representa el efecto de la temperatura en el tiempo de hidrólisis a diferentes condiciones, se puede simbolizar como una campana de Gauss, es decir, una curva con un **máximo**. En la literatura se han reportado diferentes temperaturas óptimas para esta enzima, probablemente debido a que la materia prima usada para esos estudios fue diferente. Sin embargo, el valor de temperatura (55 °C) que produjo el máximo de grado de hidrólisis en este trabajo coincide con las condiciones de operación para esta variable de (Apar & Özbek 2010), donde producen hidrolizados de proteína de Maíz usando Alcalasa 2.4L, a una concentración de proteína de 0.3% w/v, pH 8 y T 55 °C.

6.2.2. Efecto del pH sobre el grado de hidrólisis

Para evaluar el efecto del pH, se mantuvieron constantes la temperatura y la relación enzima/sustrato en 55 °C y 0.07 AU/g, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 6.2 el pH también tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de grado de hidrólisis, ($p < 0.05$). Puede verse en la Figura. 6.2 que cuando el pH=8 se obtiene el mayor grado de hidrólisis (GH>37%). El grado de hidrólisis obtenido a valores de pH=7 y 9 a un tiempo de cinco horas fue similar $\approx 25\%$, es decir no existe diferencia significativa entre estos dos valores de pH. Durante las cinco horas de proceso las cinéticas presentan la misma tendencia obteniendo un grado de hidrólisis mayor siempre a pH 8.

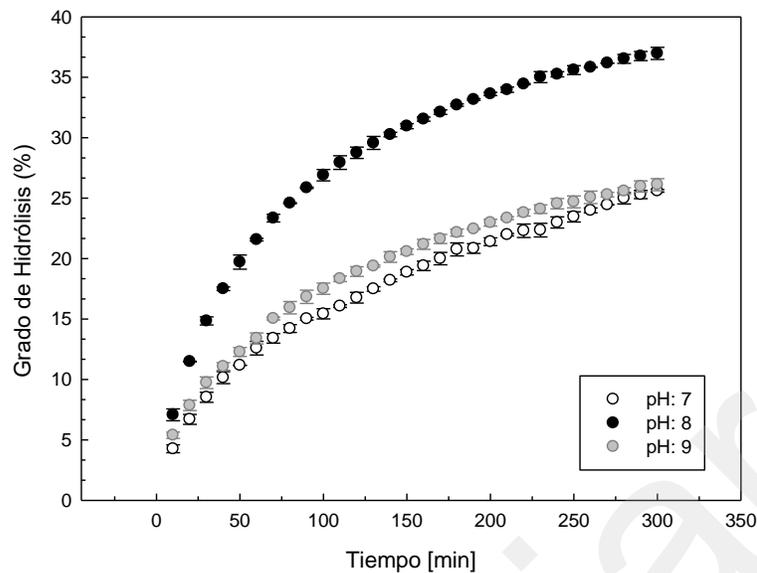


FIGURA 6.2. Efecto del pH sobre el porcentaje de hidrólisis a T 55 °C y E/S=0.07 AU/g de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa. Concentración de proteína: 5% p/v.

Diversos trabajos han reportado un pH=8 como la mejor condición de operación para este factor, tal es el caso de (Adamson & Reynolds 1996); (Guérard *et al.*, 2001); (Chabanon *et al.*, 2007); (Klompong *et al.*, 2007); (Apar & Özbek 2010); (Valencia *et al.*, 2014). Aunque la proteína de yema de huevo libre de lecitina no fue usada en ninguna de estas investigaciones.

(Bhaskar *et al.*, 2008) también reportó que el pH tiene un efecto significativo sobre el grado de hidrólisis, presentando la misma tendencia que la encontrada en este trabajo; sin embargo, el pH reportado por estos autores como óptimo fue de 8.5 con proteína de pescado.

6.2.3. Efecto de la relación enzima/sustrato sobre el grado de hidrólisis.

En el estudio del efecto de la relación enzima/sustrato (E/S) sobre el grado de hidrólisis se mantuvieron constantes los valores de temperatura (55 °C) y pH (8). Estos valores corresponden a los mejores encontrados anteriormente. Los resultados indicaron que

la relación enzima/sustrato tiene un efecto significativo sobre el grado de hidrólisis, ($p < 0.05$) en el intervalo estudiado (Figura. 6.3). Se observó que al aumentar el valor de E/S aumenta el porcentaje de grado de hidrólisis. También se observa en la Figura. 6.3 que después de 5 horas de operación, las reacciones donde se usaron relaciones enzima/sustrato de 0.07 AU/g y 0.09 AU/g alcanzaron valores similares de grado de hidrólisis, 28 y 31% respectivamente.

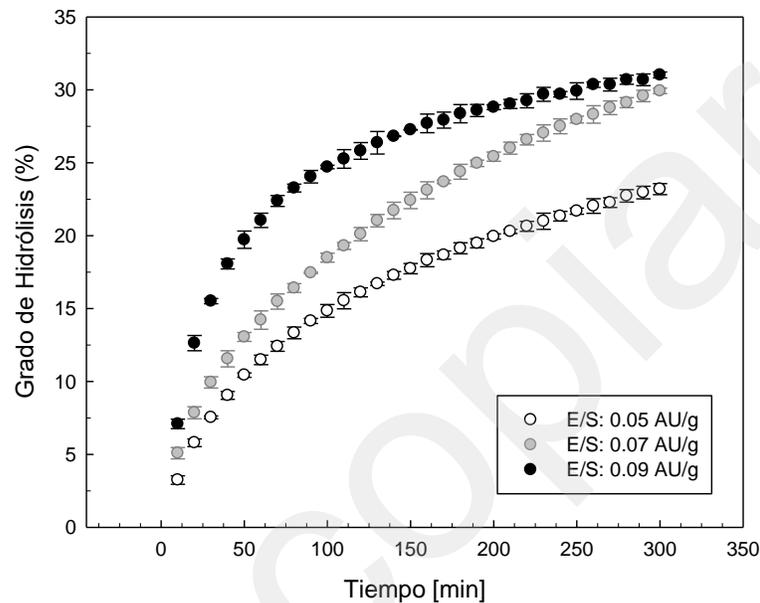


FIGURA 6.3. Efecto de E/S sobre el porcentaje de hidrólisis a T 55 °C y pH 8 de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa. Concentración de proteína: 5% p/v.

En base a los resultados obtenidos se decidió probar un intervalo mayor de E/S (0.14 a 0.35 AU/g proteína) con el fin de encontrar la mejor condición para llevar a cabo el proceso de hidrólisis. Los resultados se presentan en la Figura 6.4.

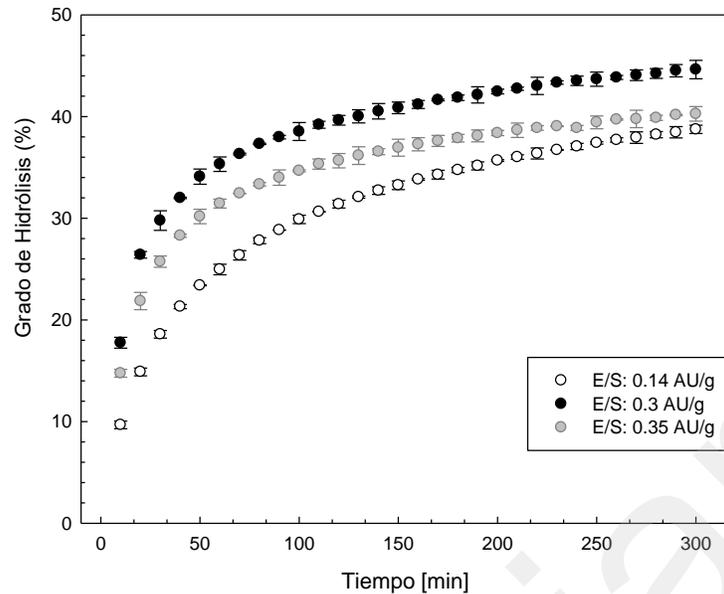


FIGURA 6.4. Efecto de E/S sobre el porcentaje de hidrólisis a T 55 °C y pH 8 de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa. Concentración de proteína: 5% p/v.

De la Figura 6.4 se puede observar que al aumentar el valor de E/S de 0.14 AU/g a 0.3 AU/g aumenta el grado de hidrólisis ($\approx 6\%$), sin embargo, cuando el valor de E/S aumenta hasta 0.35 AU/g el grado de hidrólisis disminuye, con 0.3 AU/g el grado de hidrólisis es de $\approx 44\%$, mientras con 0.35 AU/g es de $\approx 39\%$. También se puede observar en la Figura 6.4 que después de cinco horas de operación la relación enzima/sustrato de 0.14 AU/g y 0.35 AU/g, alcanzan valores similares de grado de hidrólisis, 38 y 39% respectivamente. Sin embargo, la velocidad inicial de reacción para una relación enzima/sustrato de 0.35 AU/g es mayor comparada con 0.14 AU/g (258 y 173 g/L h, respectivamente), por lo tanto, el valor similar de grado de hidrólisis a las cinco horas de reacción se puede atribuir a una producción de péptidos que causan una posible inhibición por producto.

Esta tendencia coincide con la relación enzima/sustrato de 0.07 AU/[B16][u17]g y 0.09 AU/g, presentada en la gráfica anterior. Después de cinco horas de proceso el grado de hidrólisis es de $\approx 45\%$ a una relación enzima/sustrato de 0.3 AU/g, en una dispersión de 5% w/v.

La relación enzima/sustrato de 0.3 AU/g también fue reportada para la producción de hidrolizados de proteína de cacahuete por (Quist *et al.*, 2009), utilizando Alcalasa 2.4L, sin embargo, el grado de hidrólisis obtenido fue de 23%, a una concentración de proteína de 1.23% w/w.

6.2.4. Efecto de la concentración inicial de proteína sobre el grado de hidrólisis.

La empresa Fresenius está interesada en procesar una concentración de proteína de al menos 30% w/v, por lo que se estudió el efecto de la concentración de proteína sobre el grado de hidrólisis. Para este estudio se mantuvieron constantes las condiciones de temperatura, pH y relación enzima/sustrato en 55 °C, pH 8 y 0.3 AU/g, respectivamente.

Los resultados mostraron que a una concentración inicial de proteína de 5% y 10% los valores de porcentaje de grado de hidrólisis son los mismos ($\approx 43\%$), sin embargo cuando el porcentaje de proteína inicial aumenta al 20%, el grado de hidrólisis disminuye de 47 a 35% (Figura 6.5).

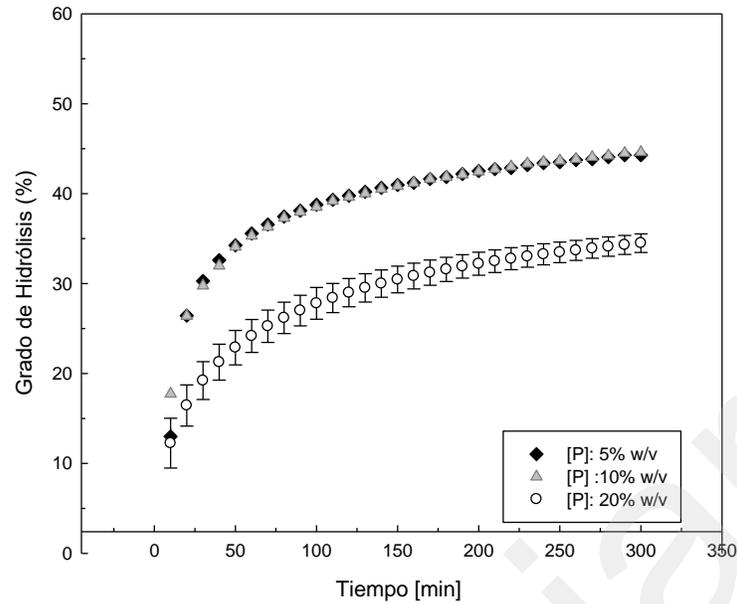


FIGURA 6.5. Efecto de la concentración de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10% p/v de grasa a pH 8 y T 55 °C sobre el grado de hidrólisis.

La disminución del porcentaje de hidrólisis puede atribuirse a una inhibición por sustrato y/o a problemas de mezclado en los primeros minutos de reacción.



FIGURA 6.6. Mezcla inicial para hidrólisis al 20% de proteína.

Es importante mencionar que la mezcla de hidrólisis conteniendo un 30% de proteína inicial presentó problemas serios de mezclado y heterogeneidad, ya que la agitación magnética no fue suficiente para alcanzar una homogeneidad completa (Figura 6.7).

Debido a esto, no fue posible llevar a cabo la reacción de manera adecuada, ya que al inicio se presentaron gradientes de temperatura y pH, y esto alteró la cantidad de base agregada y por lo tanto el valor final de grado de hidrólisis.



FIGURA 6.7. Mezcla inicial para hidrólisis al 30% de proteína.

En otro estudio reportado para la producción de hidrolizados de proteínas de yema de huevo la mayor concentración de proteína utilizada fue de 10% w/v (Zambrowicz *et al.*, 2015). Por otro lado, en los trabajos reportados sobre la producción de hidrolizados con Alcalasa 2.4L de diferentes proteínas, la concentración es de hasta 13% w/v (Chabanon *et al.*, 2007), por lo que no es posible comparar directamente el grado de hidrólisis obtenido a una concentración de 20% w/v con Alcalasa 2.4L.

En el estudio realizado por (Bhaskar *et al.*, 2008), reportan un aumento en el grado de hidrólisis, al aumentar a relación enzima/sustrato, hasta alcanzar una fase estacionaria con relación enzima/sustrato al 1.5% v/w o superior.

6.2.5. Ajuste del modelo de Weibull a las cinéticas de reacción.

Se ajustó el modelo de Weibull (Wang *et al.*, 2015) a las cinéticas de reacción, con el fin de determinar el grado de hidrólisis máximo (DH_m) que se alcanzaría en las diferentes condiciones de pH, temperatura y E/S probadas.

$$DH = DH_m \left[1 - e^{-\left(\frac{t}{MDHT}\right)^B} \right]$$

Donde MDHT= tiempo en el que se obtiene la mitad del máximo grado de hidrólisis y B= parámetro de forma.

La Figura. 6.8 muestra que el modelo describe con una precisión aceptable la cinética de la hidrólisis bajo todas las condiciones de operación probadas. El factor de correlación entre los datos experimentales y el modelo fue $R > 0.95$ para todos los casos analizados.

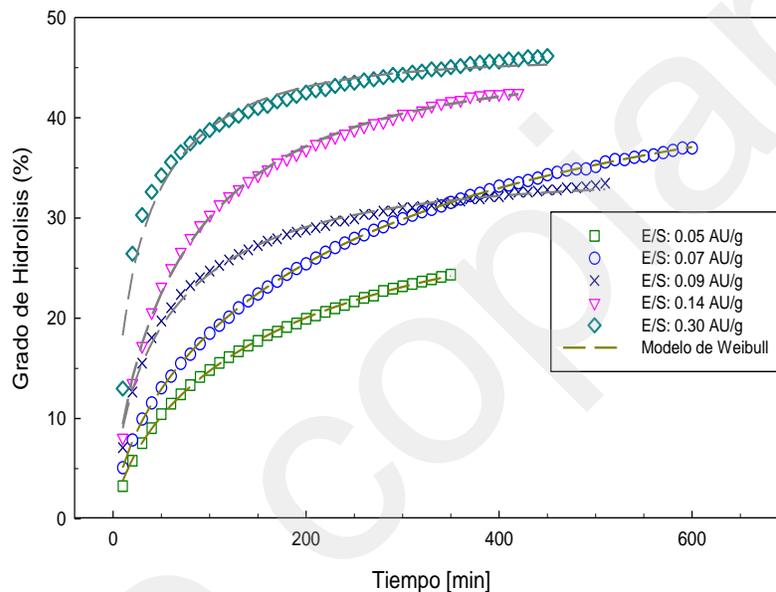


FIGURA 6.8. Ajuste del modelo de Weibull a las cinéticas de hidrólisis realizadas a diferentes valores de E/S. Las condiciones de temperatura (55 °C), pH (8.0), concentración de proteína (5% w/v) y contenido de grasa (10% w/v) se mantuvieron constantes.

En la Tabla. 6.2 se presentan de manera resumida los resultados de las variables del modelo de Weibull para todos los casos. Puede verse que el grado de hidrólisis máximo que se obtuvo cuando se hidrolizó una dispersión de 10% w/w de proteína usando una relación E/S=0.3 AU/g fue ≈48% con un MDHT de 35.18 min. Por otro lado, el máximo grado de hidrólisis predicho por el modelo para la reacción donde se usó una concentración de proteína de 20% w/v fue de 32.11% con un MDHT ligeramente mayor (36.27 min). Los resultados del modelo coinciden con los resultados

experimentales, demostrando una vez más la buena correlación del modelo con las cinéticas. Los resultados obtenidos a partir del modelo de Weibull son una herramienta importante en la determinación de las mejores condiciones para llevar a cabo el proceso de hidrólisis enzimática.

TABLA 6.2. Grado máximo de hidrólisis (DHm) y tiempo medio de grado de hidrólisis (MDHT) obtenidos del ajuste del modelo de Weibull a las cinéticas de reacción con diferente relación enzima/sustrato y concentración de proteínas, 10% grasa.

Concentración de proteína: 5% w/v			
E/S (AU/g prot)	DHm (%)	MDHT (min)	B
0.05	30.49	181.08	0.6965
0.07	46.07	279.83	0.644
0.09	33.91	67.35	0.6148
0.14	44.75	85.33	0.673
0.30	45.82	32.59	0.5701
Concentración de proteína: 10% w/v			
0.07	42.71	251.90	0.61
0.14	45.54	93.69	0.569
0.30	47.85	35.18	0.4684
0.35	44.20	42.96	0.4763
Concentración de proteína: 20% w/v			
0.30	32.11	36.27	0.5949

El valor de grado de hidrólisis máximo que se obtuvo ($\approx 48\%$) a un valor de $E/S=0.3$ AU/g y una concentración de proteína de 10% son similares a los reportados por (Zambrowicz *et al.*, 2015), quienes obtuvieron un grado de hidrólisis de 45% para la hidrólisis enzimática de proteína de yema de huevo, con 10% w/v y una relación enzima/sustrato de 0.25 AU/g. Sin embargo, la enzima utilizada por estos autores fue la pepsina.

6.2.6. Efecto del contenido de grasa sobre el grado de hidrólisis.

Se evaluó el efecto del contenido de grasa en el preparado de proteína de yema de huevo libre de lecitina sobre el grado de hidrólisis. Los resultados indicaron que un contenido de grasa en la materia prima entre 0 y 10% no tiene un efecto significativo sobre el grado de hidrólisis, ($p < 0.05$). Puede verse en la Figura. 6.9 que en una dispersión de proteína de 20% w/v con y sin grasa se obtiene $\approx 35\%$ de grado de hidrólisis. Además, que el modelo de Weibull se ajustó a las cinéticas de reacción con un $R > 0.98$, los parámetros obtenidos del ajuste del modelo de Weibull (DHm=37.31%, MDHT=51.91 para la hidrólisis enzimática con 0% de grasa, y DHm= 36.76% MDHT=52.42 para la hidrólisis enzimática con 10% de grasa) coinciden con los resultados experimentales obtenidos, es decir, no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos.

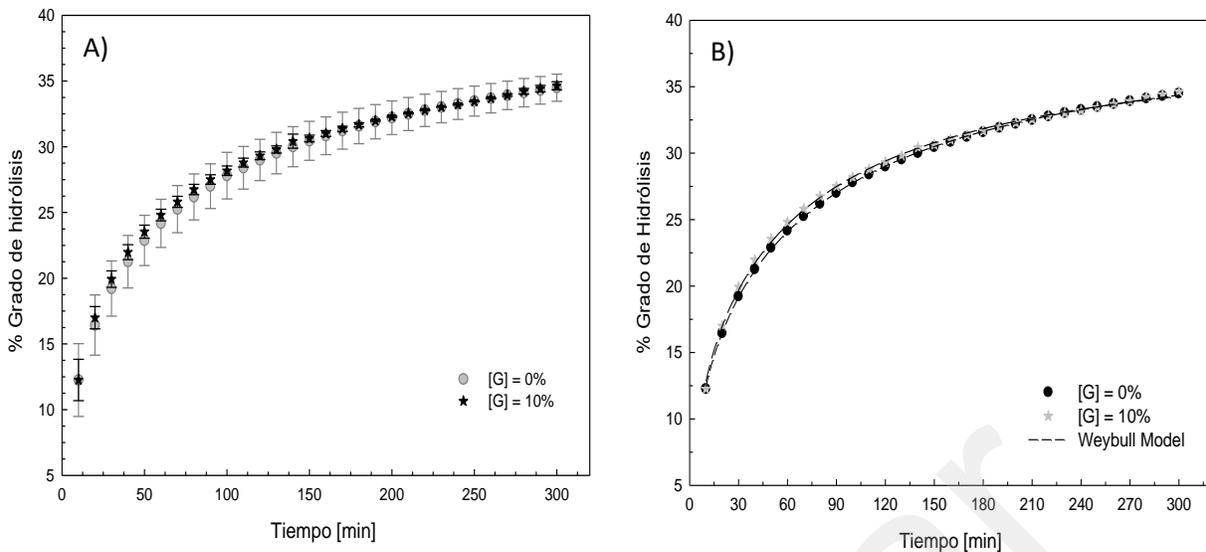


FIGURA 6.9. Efecto de la concentración de grasa sobre el grado de hidrólisis. Las condiciones de temperatura (55 °C), pH (8.0), concentración de proteína (5% w/v) se mantuvieron constantes. A) Desviaciones estándar de las cinéticas de reacción. B) Ajuste del modelo de Weibull a las cinéticas de reacción.

No se encontraron reportes donde se estudie el efecto de grasa presente en la mezcla de hidrólisis sobre el grado de hidrólisis. En los trabajos reportados por (Eckert *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2001; Zambrowicz *et al.*, 2012; Zambrowicz *et al.*, 2015), el contenido de grasa de las materias primas generalmente es reducido ($\approx 10\%$), ninguno de estos autores presenta el método de extracción de grasa. Por el contrario, (Jeong *et al.*, 2014) [B18][u19], presentan el proceso de extracción Soxhlet con una mezcla de benceno y alcohol, antes del proceso enzimático, con el fin de disminuir el contenido de grasa de la materia prima. El objetivo de la extracción de grasa de la materia prima se debe a que ésta posiblemente podría interferir en el sitio catalítico de la enzima, lo que reduciría la velocidad de reacción.

6.2.7. Fraccionamiento del hidrolizado de proteínas de yema de huevo libre de lecitina empleando un sistema de flujo pistón.

El hidrolizado obtenido con las mejores condiciones de proceso (pH 8, T=55 °C y E/S=0.3 AU/g); fue ultrafiltrado con membranas de celulosa regenerada de MWCO de 10, 5 y 1 kDa. Todas las membranas fueron modificadas con luz UV de acuerdo al método descrito en la sección 5.4 para disminuir los fenómenos de adsorción sobre la superficie de las mismas. Se utilizó un sistema de flujo pistón donde el hidrolizado se filtró con la membrana de MWCO de 10 kDa inicialmente. El permeado de esta membrana fue procesado con la membrana de MWCO de 5 kDa para posteriormente ser fraccionado usando la membrana de MWCO de 1 kDa. Los resultados presentados en la Figura. 6.10 señalan valores de flux estables durante 180 min de proceso para todas las membranas. Puede verse que al disminuir el tamaño de poro de la membrana, el flux de permeado también disminuye, este resultado es esperado para este tipo de procesos ya que el área de filtración es menor a medida que se reduce el tamaño de poro. El flux de permeado para la membrana de MWCO de 10 kDa fue de 4 Kg/h m², para la membrana de MWCO de 5 kDa fue de ≈2.4 Kg/h m², finalmente, para la membrana de MWCO de 1 kDa se obtuvo un valor de flux de 2 Kg/h m².

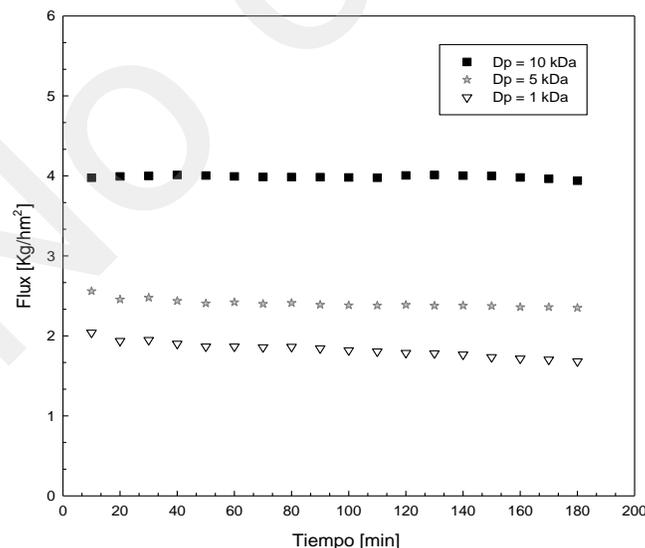


FIGURA 6.10. Perfiles de Flux de permeado obtenidos durante el fraccionamiento de los hidrolizados empleando membranas de celulosa regenerada de MWCO de 10, 5 y 1 kDa. Temperatura 25 °C.

Los resultados presentados en la Figura. 6.11 muestran que el protocolo de lavado establecido permite la recuperación total de la membrana de 10 kDa después del proceso de ultrafiltración.

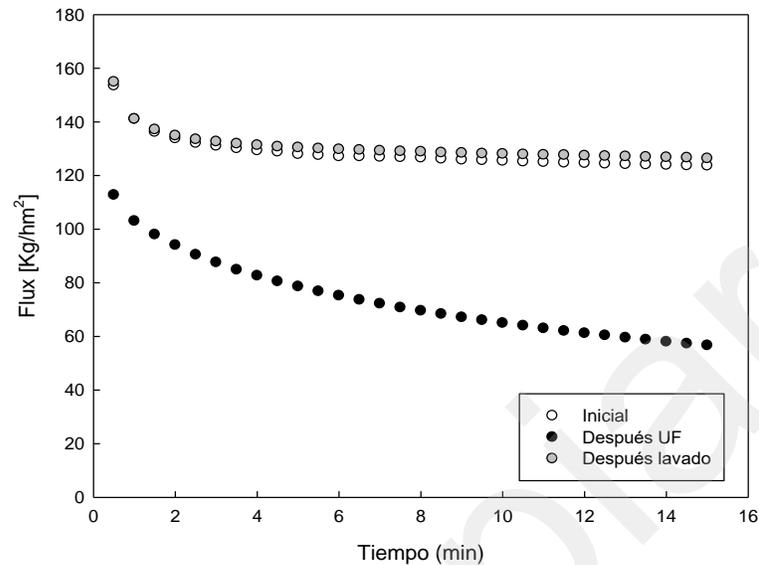


FIGURA 6.11. Recuperación del flux de agua después de la limpieza de la membrana de ultrafiltración. Membrana celulosa regenerada 10 kDa, presión 1 bar.

El flux de permeado de agua disminuyó hasta un 60% después del proceso de ultrafiltración, sin embargo, éste fue recuperado en su totalidad después del lavado de la membrana. Es decir, el ensuciamiento de la membrana fue reversible. Las membranas fueron lavadas con una solución enzimática al 10% (Tergazyme - Alconox) a una temperatura de 45 °C durante 10 min.

6.2.8. Efecto de la concentración de grasa sobre el desempeño de las membranas durante el fraccionamiento

Se evaluó el efecto de la concentración de grasa sobre el flux de permeado de las membranas usadas durante el fraccionamiento de los hidrolizados. Se observó que la presencia de grasa (10%) en la mezcla de reacción disminuyó hasta un 50% el flux de permeado de la membrana de MWCO de 10 kDa (Figura. 6.12). Sin embargo, los resultados indicaron que la grasa fue retenida completamente por la membrana de

MWCO de 10 kDa, ya que el flux de la membrana de MWCO de 5 kDa no varió significativamente cuando se procesó el permeado de la membrana de MWCO de 10 kDa con las muestras de 10 y 0% de grasa inicial. Además, se observó que el flux de la membrana de MWCO de 1 kDa fue ligeramente superior cuando se filtró el permeado proveniente del hidrolizado conteniendo 10% de grasa, lo que significa que posiblemente la concentración de péptidos en las dos muestras es diferente (mayor en el hidrolizado con 0% de grasa). En la Figura. 6.13 se puede observar que las características visuales de estos permeados fueron similares.

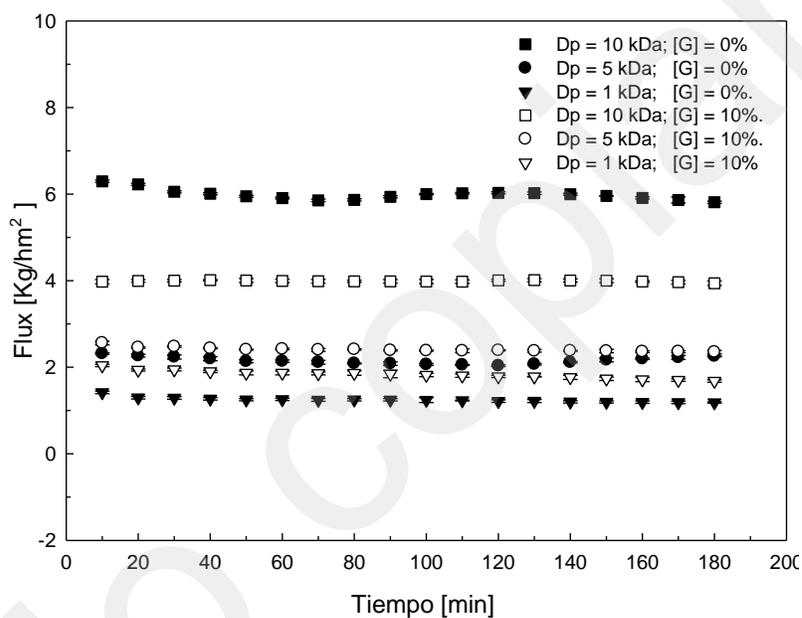


FIGURA 6.12. Efecto de la concentración de grasa sobre el flux de permeado. Membrana de 10, 5 y 1 kDa, con y sin grasa.

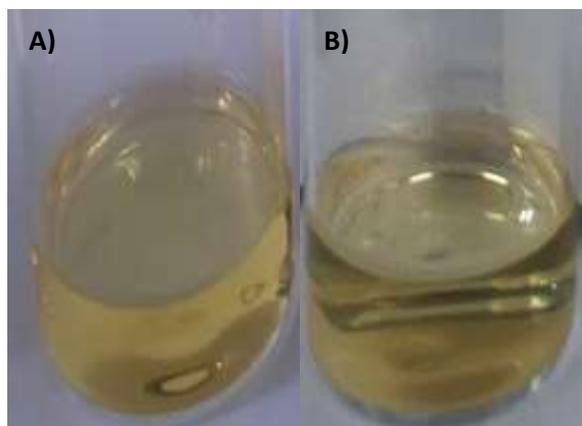


FIGURA 6.13. Fracción del hidrolizado obtenido con membranas de MWCO de 1 kDa a partir de proteína de yema de huevo libre de lecitina. A) Fracción proveniente de hidrolizado con 0% grasa. B) Fracción proveniente de hidrolizado con 10% grasa.

No se encontraron reportes sobre el efecto del contenido de grasa en la mezcla de reacción sobre el desempeño de las membranas de UF utilizadas durante el fraccionamiento de hidrolizados de proteína de yema de huevo. Sin embargo, sí se ha reportado para la ultrafiltración de otros productos. En los trabajos de (Yi *et al.*, 2011; Amin *et al.*, 2010), se reporta el estudio de la concentración de grasa sobre el flux de permeado de membranas de microfiltración, encontrando resultados que coinciden con este trabajo, que al aumentar la concentración de grasa, disminuye el flux de permeado.

6.3. Caracterización de los hidrolizados de proteína de yema de huevo libre de lecitina

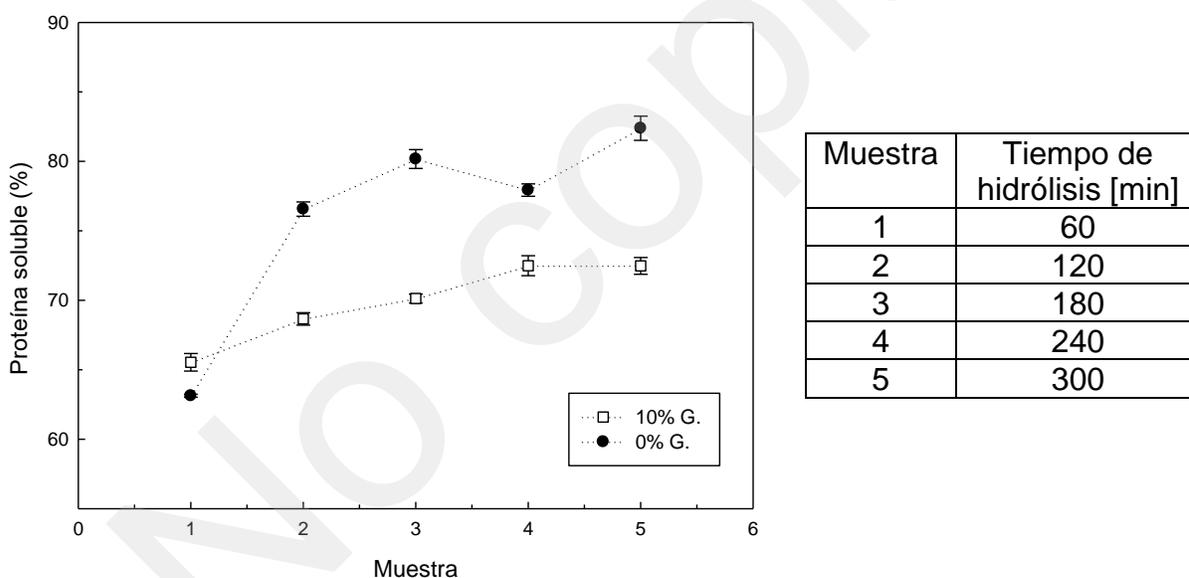
Los hidrolizados se caracterizaron en términos de contenido de proteína soluble, estabilidad térmica y rango de peso molecular.

6.3.1. Solubilidad

Se observó que el contenido de proteína soluble aumentó conforme aumentó el tiempo de hidrólisis en una dispersión inicial de proteína de 20%, en la primera hora de hidrólisis el contenido de proteína soluble fue de 63% y 65% para hidrolizados con 0 y 10% de grasa respectivamente, y al finalizar la hidrólisis (5 h) el contenido de proteína

soluble fue de 81 y 72% para hidrolizados con 0 y 10% de grasa respectivamente. Los resultados de la Figura. 6.14 indican que la grasa tuvo un efecto negativo sobre el contenido de proteína soluble del hidrolizado, ya que a un tiempo de cinco horas de proceso se alcanza hasta un 81% de proteína soluble para los hidrolizados obtenidos a partir de preparados de proteína sin grasa, mientras que para los que tuvieron un contenido de grasa de 10%, la concentración de proteína soluble solo alcanzó 72%.

Estos resultados son similares a los reportados por (Klompong *et al.*, 2007) quienes también encontraron que la solubilidad de las proteínas aumenta con el proceso de hidrólisis enzimática. Ellos reportaron valores de solubilidad para hidrolizados de proteína de pescado superiores a 85%, sin embargo, la concentración inicial de proteína en la mezcla de reacción fue mucho menor (4.7%).



FIGUA 6.14. Efecto de la concentración de grasa sobre el contenido de proteína soluble de los hidrolizados de proteína de yema de huevo libre de lecitina.

6.3.2. Estabilidad Térmica

Se evaluó la estabilidad térmica (las muestras de hidrolizados a diferentes horas de hidrólisis, fueron calentados durante un min a 93 °C) de los hidrolizados producidos en función del tiempo de hidrólisis en mezclas de reacción sin grasa y conteniendo 10%

de grasa. Los resultados sugieren que la estabilidad de los hidrolizados aumentó con el tiempo de hidrólisis (Figura. 6.15). Es decir, la estabilidad al tratamiento térmico de los hidrolizados aumentó cuando el grado de hidrólisis de la proteína fue mayor.

En la Figura. 6.15 se puede observar también que la estabilidad térmica (%) es ligeramente inferior para los hidrolizados con presencia de grasa, también que la estabilidad térmica aumenta a través del tiempo de hidrólisis, sin embargo, este aumento solo es $\approx 10\%$ comparando los datos de la primera y la quinta hora de hidrólisis.

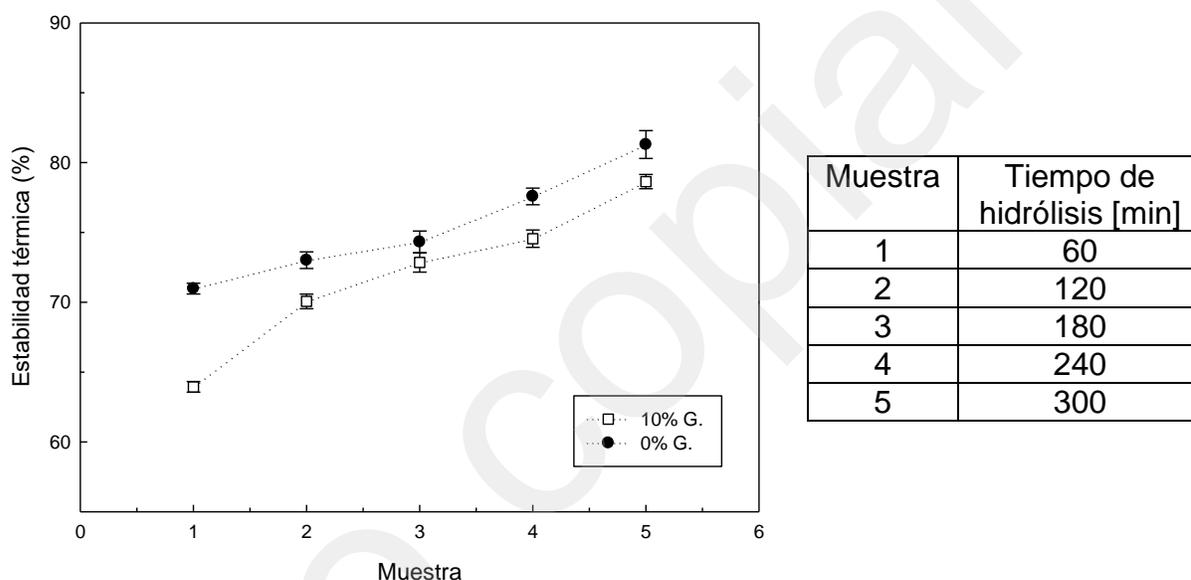


Figura 6.15. Estabilidad térmica de los hidrolizados obtenidos a partir de proteína de yema de huevo libre de lecitina con 10 y 0% de grasa.

No se encontraron datos reportados en la literatura sobre esta propiedad funcional de hidrolizados de ningún tipo de proteína. Sin embargo, los resultados sugieren una solubilidad de 80% después del tratamiento térmico.

6.3.3. Clasificación de las fracciones peptídicas obtenidas por ultrafiltración

Se llevó a cabo la separación por ultrafiltración (empleando membranas de MWCO de 10, 5 y 1 kDa en serie) de los péptidos presentes en la mezcla final de hidrólisis

obtenida a partir de una concentración inicial de 20% de proteína con 10% y 0% de grasa. Considerando que la base de la separación por UF es el peso molecular, se clasificaron las fracciones obtenidas, tanto en el retenido como en el permeado de las tres membranas empleadas durante el fraccionamiento, en función del peso molecular de corte de las mismas. Los resultados se resumen en las Tablas 6.3 y 6.4. Puede verse que la mayor cantidad de péptidos presentes en el hidrolizado con y sin grasa se obtuvieron en el permeado de la membrana de MWCO de 1 kDa. Esto indica que la mayoría de los péptidos producidos bajo las condiciones de hidrólisis establecidas, con y sin grasa, poseen un peso molecular ≤ 1 kDa. Sin embargo, la concentración de péptidos ≤ 1 kDa fue ligeramente superior ($\approx 5\%$) en los hidrolizados obtenidos a partir de una mezcla de reacción sin grasa, tomando como base la proteína total hidrolizada. Es decir 69.05% (Tabla 6.4) *versus* 64.56% (Tabla 6.3).

TABLA 6.3. Rango de peso molecular de las fracciones obtenidas por ultrafiltración empleando membranas de celulosa regenerada de 10, 5 y 1 kDa. 10% Grasa.

Rango de peso molecular	Proteína soluble hidrolizada (%)	Proteína total hidrolizada (%)
PM > 10 kDa	4.67	26.55
10 > PM > 5 kDa	1.62	1.25
5 > PM > 1kDa	9.92	7.64
PM < 1 kDa	83.79	64.56

TABLA 6.4. Rango de peso molecular de las fracciones obtenidas por ultrafiltración empleando membranas de celulosa regenerada de 10, 5 y 1 kDa. 0% Grasa.

Rango de peso molecular	Proteína soluble hidrolizada (%)	Proteína total hidrolizada (%)
> 10 kDa	1.60	14.62
10 > PM > 5 kDa	3.66	3.18
5 > PM > 1kDa	15.16	13.15
PM < 1 kDa	79.58	69.05

También se observó que en los hidrolizados obtenidos a partir de una dispersión de proteína con 10% grasa, solo el 4.67% de proteína soluble fue retenida por la membrana de MWCO de 10 kDa, mientras que una fracción de aproximadamente 11% posee un peso molecular en un rango de 1 a 10 kDa.

Por otro lado el porcentaje de proteína total retenida por la membrana de MWCO de 10 kDa de los hidrolizados sin grasa fue de 14.62%, un porcentaje menor que la encontrada para las fracciones obtenidas de hidrolizados con grasa (26.55%). La fracción de péptidos con pesos molecular entre 1 y 10 kDa para los hidrolizados sin grasa fue de 16.3%, mientras los encontrados para los hidrolizados sin grasa fue de 8.9%. Y finalmente el contenido de péptidos de peso molecular menor a 1 kDa también fue mayor para los hidrolizados sin grasa (69.05% vs 64.56%).

CONCLUSIONES

Los resultados indicaron un efecto significativo ($p < 0.05$) del pH, la temperatura y la relación E/S sobre el grado de hidrólisis (%) en el intervalo estudiado.

El grado de hidrólisis disminuye al aumentar la concentración de proteína a 20%, probablemente debido a inhibición por sustrato y problemas de mezclado durante la reacción (gradientes de pH y de temperatura).

El contenido de grasa no tuvo efecto en el grado de hidrólisis, sin embargo, afectó de manera significativa el flux de la membrana de 10 kDa. Además, se observó una ligera disminución en la solubilidad y estabilidad térmica del hidrolizado.

El modelo de Weibull permitió estimar el grado de hidrólisis máximo para todas las condiciones de estudio. El DHm = 47% obtenido para una concentración de proteína de 10% w/v a una relación E/S 0.3 AU/g, fue mayor que los reportados en la literatura para las diferentes enzimas probadas con proteínas de yema de huevo.

El rango de peso molecular (< 1 kDa) de los hidrolizados obtenidos a partir de proteínas de yema de huevo, sugieren que estos tienen un potencial de aplicación importante en la industria farmacéutica.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamson, N.J. & Reynolds, E.C., 1996. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3), pp.202–207.
- Adler-Nissen, J., 2002. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(May), pp.1256–1262.
- Amin, I.N.H.M. Mohammad, A.W.; Markom, M.; Peng, L. C.; Hilal, N., 2010. Flux decline study during ultrafiltration of glycerin-rich fatty acid solutions. *Journal of Membrane Science*, 351(1–2), pp.75–86.
- Apar, D.K. & Özbek, B., 2010. Corn Gluten Hydrolysis By Alcalase: Kinetics of Hydrolysis. *Chemical Engineering Communications*, 197(7), pp.963–973.
- Benítez, R., Ibarz, A. & Pagan, J., 2008. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), pp.227–237.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R.G., 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99(2), pp.335–343.
- Castro, R.J.S. De & Sato, H.H., 2014. Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), pp.80–88.
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., Marc, I., 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42(10), pp.1419–1428.
- Chrumbach, A. & Rodbard, D., 1971. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Science*, 172.
- Demirhan, E., Apar, D.K. & Özbek, B., 2011. A Kinetic Study on Sesame Cake Protein Hydrolysis by Alcalase. *Journal of Food Science*, 76(1), pp.C64–C67.
- Diniz, F.M. & Martin, A.M., 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 31(5), pp.419–426.

- Eckert, E., Zambrowicz, A., Pokora, M., Bartosz, S., Szoltysik, M., Szewczuk, Z., Polanowski, A., Trziska, T., Chrzanowska, J., 2014. Egg-yolk protein by-product as a source of ACE-inhibitory peptides obtained with using unconventional proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *Journal of Proteomics*, 110, pp.107–116.
- Giese, J., 1994. Proteins as ingredients: Types, Functions, Applications. Food Technology, Special report, pp. 50-60.
- Grobas, S., Mateos, G.G., 1996. Influencia de la nutrición sobre la composición nutricional del huevo. XII Curso de especialidad FEDNA
- Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., Binet, A., 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna *Thunnus albacares* / wastes using Alcalase.
- James, C.S, 1999. Analytical Chemistry of Foods: An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
- Jeong, H.S., Kim, H.Y., Ahn, S.H., Oh, S.C., Yang, I., Choi, I.G., 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for extraction of pectin from rapeseed cake (*Brassica napus* L.) using commercial enzymes. *Food Chemistry*, 157, pp.332–338.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), pp.1317–1327.
- Laca, A., Paredes, B. & Díaz, M., 2010. A method of egg yolk fractionation. Characterization of fractions. *Food Hydrocolloids*, 24(4), pp.434–443.
- Lindley, H., 1954. The mechanism of action of hydrolytic enzymes. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 15, pp. 271-299.
- Liu, J., Jin, Y., Lin, S., Jones, G.S., Chen, F., 2015. Purification and identification of novel antioxidant peptides from egg white protein and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 175, pp.258–266.
- Muzaifa, M., Safriani, N. & Zakaria, F., 2012. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *International Journal of the Bioflux Society*, 5(1), pp.36–39.
- Nielsen, H., 2007. Production of phospholipids from spray-dried egg yolk by consecutive in situ solid phase extraction with acetone and ethanol. *LWT - Food Science and Technology*, 40(8), pp.1337–1343.
- Normah, I., Jamilah, B., Saari, N., Yaakob, C.M., 2004. Optimization of Hydrolysis

Conditions for the production of threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) hydrolysate by alcalase. *Journal of Muscle Foods*, 16, pp.87–102.

Novo Nordisk., 1998. Environment & Bioethics Report.

Nyström M., Järvinen P., 1991. Modification of polysulfone ultrafiltration membranes with UV irradiation and hydrophilicity increasing agents. *Journal Membrane Science*, 60, pp. 275-296.

Orcajo, J., Marcet, I., Paredes, B., Díaz, M., 2013. Egg yolk hydrolysed granules: Characteristics, rheological properties and applications. *Food and Bioprocess Processing*, 91(4), pp.457–463.

Park, P.J., Jung, W.K., Nam, K.S., Shahidi, F., Kim, S.K., 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), pp.651–656.

Quist, E.E., Phillips, R.D. & Saalia, F.K., 2009. The effect of enzyme systems and processing on the hydrolysis of peanut (*Arachis hypogaea* L.) protein. *LWT - Food Science and Technology*, 42(10), pp.1717–1721.

Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(3), pp.597–635.

Severin, S. & Xia, W., 2006. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Journal of food biochemistry*, 30(1), pp.77–97.

Sousa, R. de C.S., Coimbra, J.S.R., Garcia, E.E., Minium, L.A., Oliveira, F.C., Minium, V.P.R., 2006. Effect of pH and salt concentration on the solubility and density of egg yolk and plasma egg yolk. *LWT - Food Science and Technology*, 40(7), pp.1253–1258.

Spellman, D., McEvoy, E., O'Cuinn, G., FitzGerald, R.J., 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), pp.447–453.

Steinhardt J. & Beychock S. (1964). Interaction of proteins with hydrogen ions and other small ions and molecules. *The proteins*, pp.139-304.

Valencia, P., Pinto, M. & Almonacid, S., 2014. Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), pp.258–264.

Wang, H., Yao, L. & Wang, T., 2014. Extraction of Phospholipids from Structured Dry

Egg Yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(3), pp.513–520.

- Wang, M., Han, Lijuan., Liu Shasha., Zhao, Xuebing., Yang, Jinghua., Loh, Soh., Sun, Xiaomin., Zhang, Chenxi., Fang, Xu., 2015. A Weibull statistics-based lignocellulose saccharification model and a built-in parameter accurately predict lignocellulose hydrolysis performance. *Biotechnology Journal*, 10(9), pp.1424–1433.
- Wang, X.J., Zheng, X.Q., Kopparapu, N.K., Cong, W.S., Deng, Y.P., Sun, X.J., Liu, X.L., 2014. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate. *Process Biochemistry*, 49(9), pp.1562–1569.
- Yi, X.S., Yu, S.L., Shi, W.X., Sun, N., Jin, L.M., Wang, S., Zhang, B., Ma, C., Sun, L.P., 2011. The influence of important factors on ultrafiltration of oil/water emulsion using PVDF membrane modified by nano-sized TiO₂/Al₂O₃. *Desalination*, 281(1), pp.179–184.
- Yuan, X., Gu, X. & Tang, J., 2008. Optimization of the production of *Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. protein hydrolysates with hypoglycemic effect using Alcalase. *Food Chemistry*, 111(2), pp.340–344.
- Zambrowicz, A., Pokora, M., Eckert, E., Szoltysik, M., Dabrowska, A., Chrzanowska, J., Trziszka, T., 2012. Antioxidant and antimicrobial activity of lecithin free egg yolk protein preparation hydrolysates obtained with digestive enzymes. *Functional Foods in Health and Disease*, 2(12), pp.487–500.
- Zambrowicz, A., Pokora, M., Eckert, E., Szoltysik, M., Dabrowska, A., Chrzanowska, J., Trziszka, T., 2015. Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: Isolation and characterization. *Amino Acids*, 47(2), pp.369–380.
- Zhang, M., Mu, T.-H. & Sun, M.-J., 2014. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR-Q-TOF mass spectrometer. *Food Chemistry*, 161(10), pp.148–154.
- Zheng, H. et al., 2008. Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by Alcalase. *International Dairy Journal*, 18(10–11), pp.1028–1033.