



# INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

REPORTE FINAL DE RESIDENCIA PROFESIONAL

PROYECTO:

“Estudio de la hidrólisis enzimática de proteínas de la  
harina de alpiste”

Carrera:

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

ALUMNA:

CECILIA GUADALUPE LÓPEZ ESPINOSA

No.de control:

08270342

ASESOR INTERNO:

Dra. PATRICIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE

ASESOR EXTERNO:

Dr. ELEAZAR MAXIMO ESCAMILLA SILVA

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS, JUNIO DE 2013

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	4
JUSTIFICACIÓN .....	5
OBJETIVOS .....	6
Objetivo general: .....	6
Objetivos específicos: .....	6
CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE SE PARTICIPÓ .....	7
Instituto Tecnológico de Celaya .....	7
VISIÓN. ....	7
MISIÓN.....	8
POLÍTICA DE CALIDAD.....	8
POLITICA DE EQUIDAD DE GÉNERO.....	8
ORGANIGRAMA GENERAL .....	9
PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOLOS .....	10
ALCANCES Y LIMITACIONES.....	11
Alcances .....	11
Limitaciones .....	11
FUNDAMENTO TEÓRICO .....	12
El alpiste .....	12
Taxonomía .....	12
Descripción.....	12
Usos .....	13
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS .....	14
SUSTRATOS .....	14
PROTEASAS .....	15
Hidrolizados proteicos .....	17
Mecanismo de la hidrólisis enzimática .....	19
CONDICIONES DE LA HIDRÓLISIS .....	21
Caracterización del hidrolizado .....	22
DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN APARENTE DE PESO MOLECULAR .....	26

SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS Y AMINOÁCIDOS .....	27
PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES.....	28
PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	30
CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE ALPISTE ( <i>Phalaris canariensis</i> ).....	31
PREPARACION DE LA MUESTRA.....	31
EXTRACCIÓN DE LAS PROLAMINAS .....	31
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA .....	32
RESULTADOS .....	34
Tamizado.....	34
Caracterización de la materia prima. ....	35
Extracción de las prolaminas.....	36
Hidrolisis enzimática .....	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	41
Conclusión.....	41
RECOMENDACIONES.....	41
ANEXOS .....	42
ANEXOS .....	43
ANEXOS .....	44
ANEXOS .....	45
ANEXOS .....	46
ANEXOS .....	47
ANEXOS .....	48
ANEXOS .....	49
ANEXOS .....	50
ANEXOS .....	51
ANEXOS .....	52
ANEXOS .....	53
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES .....	54

# INTRODUCCIÓN

El presente trabajo fue realizado en el instituto tecnológico de Celaya, ubicado en la ciudad de Celaya, Guanajuato, en el Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Departamento de ingeniería Química. Surge de la necesidad de encontrar nuevas fuentes de proteínas de origen vegetal y que además, sean de bajo costo.

El proyecto, se realizó con el objetivo de conocer las condiciones en las cuales se desarrolla la hidrólisis enzimática de las proteínas extraídas de la harina de alpiste con dos diferentes enzimas comerciales, la papaína y el Deterzyme® L-660.

El trabajo inicio con la caracterización de la harina de alpiste, realizando análisis granulométrico, posteriormente se desarrolló el análisis bromatológico, siguiendo los métodos establecidos por la AOAC para determinación de:

- Humedad
- Cenizas
- Fibra cruda
- Grasas
- Nitrógeno y proteínas

Posteriormente se realizó la extracción de las prolaminas y la determinación del contenido de nitrógeno proteico de las mismas, y finalmente la hidrólisis enzimática.

## JUSTIFICACIÓN

Las proteínas son el principal componente estructural y funcional de las células y tienen numerosas e importantes funciones dentro del organismo que van desde su papel catalítico hasta su función en la motilidad corporal, pasando por su papel mecánico, de transporte y almacén (hemoglobina, mioglobina, citocromos), protección (anticuerpos), reguladora (hormonas), etc.

Desde el punto de vista nutricional, las proteínas son macronutrientes presentes en los alimentos. La importancia de las proteína presentes en la dieta se debe a su capacidad de aportar aminoácidos para atender al mantenimiento de las proteínas corporales y al incremento de esta durante el crecimiento.

De acuerdo al INEGI en México existe el grave problema de la falta de consumo de proteínas vegetales, en cambio, el consumo de proteínas de origen animal es elevado, esto se debe al estrato socioeconómico de las familias, la zona de residencia, al porcentaje del ingreso familiar destinado a alimentos, entre otros. Las familias de estrato socioeconómico bajo tienen un consumo proteico deficiente, mientras que en las familias de estrato socioeconómico alto tienen un consumo excesivo de las mismas.

Este problema demuestra la necesidad de buscar diversificar fuentes alternativas de proteínas y también buscar la manera de que el beneficio de su consumo sea mayor, ya que el consumo de una sola fuente de proteínas vegetarianas no aporta las proteínas necesarias para el organismo, se necesita hacer una combinación de ellos en la dieta para obtener la proteína completa, así mismo, el consumo de proteínas vegetales que puedan representar una fuente económica y de buena calidad. Es por ello que en este trabajo se analiza a la harina de alpiste como una fuente de proteínas alterna, que pudiera ser incluida en la dieta humana.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Determinar las mejores condiciones de la hidrólisis enzimática de las proteínas extraídas de la harina de alpiste, utilizando las enzimas comerciales Deterzyme® L-660 y papaína (Propaín).

### Objetivos específicos:

1. Obtener por medio de la molienda y el tamizado, la harina de alpiste separada de la cascarilla.
2. Determinar los parámetros fisicoquímicos de la harina de alpiste, utilizando los métodos establecidos por la AOAC.
3. Extraer las prolaminas de la harina de alpiste.
4. Hidrolizar las proteínas extraídas de la harina de alpiste con proteasas comerciales

# CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE SE PARTICIPÓ

## Instituto Tecnológico de Celaya

Institución pública de educación, fundada en 1958, iniciando servicios desde secundaria técnica. Actualmente dedicada a la educación superior en niveles de licenciatura, maestría y doctorado.

El Instituto Tecnológico de Celaya, nace el lunes 14 de abril de 1958, como un Centro de Segunda Enseñanza, Capacitación Técnica para Trabajadores y Preparatoria Técnica Especializada. A partir de entonces y hasta la fecha ha evolucionado tanto en el perfil de servicios educativos como en la infraestructura.

En 1962 inician los programas de Educación Superior impartiendo la carrera de Ingeniería Industrial en diversas especialidades. En 1970 se desincorporan los estudios de secundaria y en 1984 los de bachillerato. La primera Maestría que fue la Ingeniería Química, inicio en 1980, en 1986 la de Ingeniería Mecánica, 1993 la de Ingeniería Administrativa y en 1994 la de Ingeniería Industrial. El primer programa de Doctorado inicia en 1989 y es el único que hasta la fecha se ofrece en el área de Ingeniería Química.

## VISIÓN.

Ser una Institución de Educación Superior Tecnológica reconocida internacionalmente por sus programas académicos de alta calidad orientándolos al desarrollo de competencias profesionales, mediante procesos y egresados certificados que impulsen el desarrollo del país".

Con esta visión, el Instituto tecnológico de Celaya busca contribuir a la transformación educativa en México, orientando sus esfuerzos hacia el desarrollo humano sustentable y la competitividad.

## MISIÓN.

Formar de manera integral personas comprometidas con la sociedad y con su entorno, para contribuir al desarrollo científico y tecnológico, sostenido y sustentable del país, a través de un proceso educativo pertinente, equitativo y de calidad".

## POLÍTICA DE CALIDAD.

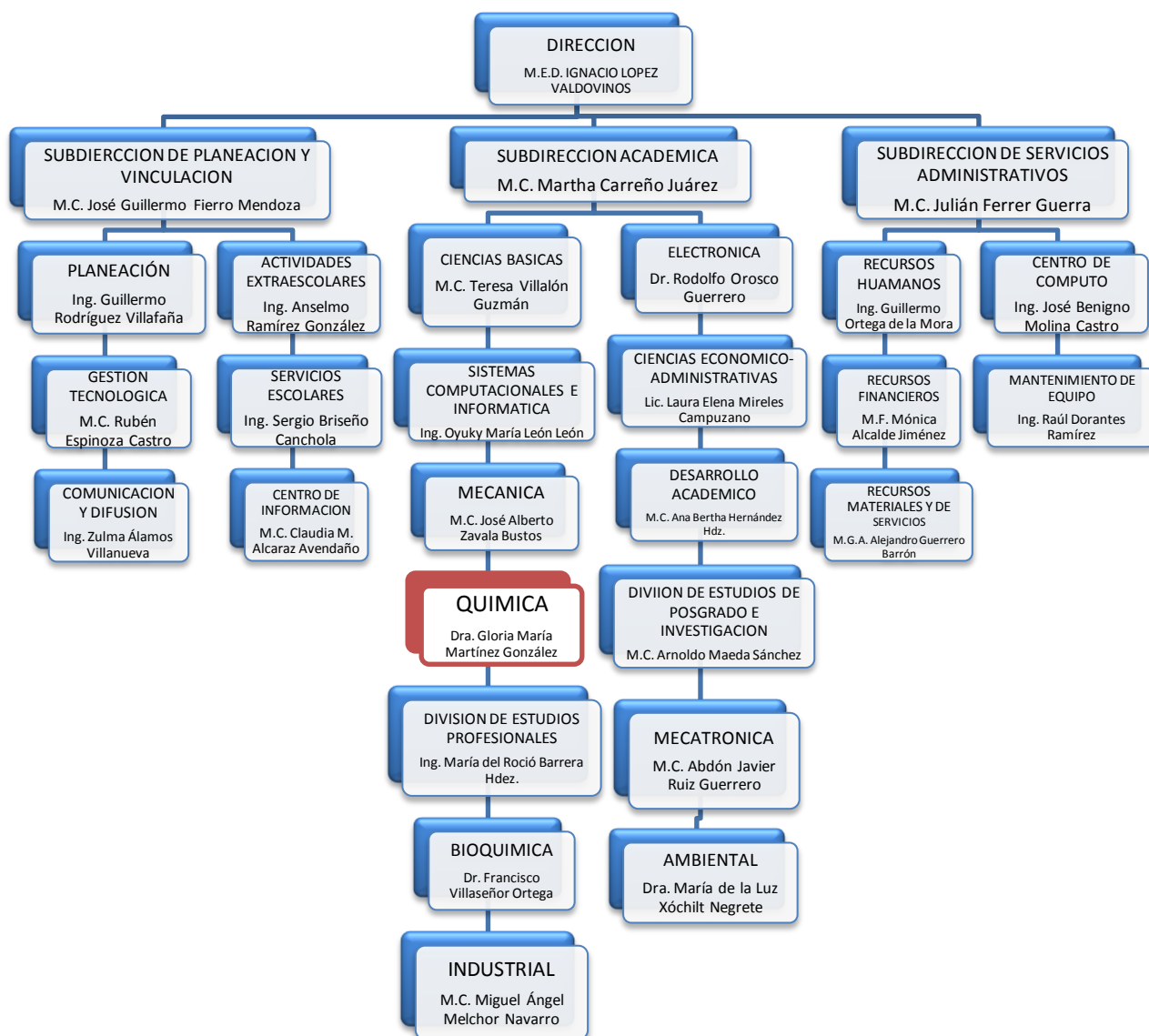
El Instituto Tecnológico de Celaya, tiene el compromiso de fomentar la mejora continua a sus procesos, buscar la satisfacción de sus clientes, tanto internos como externos, a través de la calidad de la prestación de los servicios que ofrece y así, asegurar la conformidad con los requisitos del estudiante. Por estas razones, el Instituto declara la siguiente política de calidad:"El Instituto Tecnológico de Celaya establece el compromiso de implementar todos sus procesos, orientándolos hacia la satisfacción de sus clientes sustentada en la Calidad del Proceso Educativo, para cumplir con sus requisitos, mediante la eficacia de un Sistema de Calidad y Mejora Continua, conforme a la norma ISO-9001:2008/NMX-CC-9001-IMNC-2008".

## POLITICA DE EQUIDAD DE GÉNERO.

Cuando pensamos en cambios y desarrollo de las sociedades y las culturas, la equidad de género está cada día más presente para quienes trabajan en el fortalecimiento de capacidades de los seres humanos. En esta perspectiva, el Instituto Tecnológico de Celaya promueve e implementa programas, proyectos y actividades, en conformidad con la política de equidad de género declarada a continuación:"El SNEST establece el compromiso de promover la igualdad de oportunidades en el acceso y promoción al empleo, la prevención del hostigamiento sexual y la no discriminación entre hombres y mujeres; a través, del desarrollo de acciones afirmativas y/o a favor del personal, con el propósito de mantener un ambiente de trabajo armonioso y favorecer la equidad de género.



# ORGANIGRAMA GENERAL



## PROBLEMAS A RESOLVER, PRIORIZÁNDOSLOS

Debido a que la hidrólisis de las proteínas está sujeta a algunas variables, como el pH y la temperatura, las cuales influyen potencialmente en el desarrollo de la hidrólisis, por ello es importante mantener esas variables constantes durante todo el proceso. Para ello es necesario establecer las condiciones en las que se realizará el trabajo, acondicionar el equipo y material con el que se dispone para trabajar.

Revisar su correcto funcionamiento y realizar previas pruebas antes de iniciar con el desarrollo del estudio, para evitar pérdidas de materia prima, desperdicio de soluciones y reactivos, y evitar inconvenientes durante la realización del experimento.

# ALCANCES Y LIMITACIONES

## Alcances

El alcance de este proyecto radica en la evaluación de la hidrólisis enzimática de las proteínas extraídas de la harina del alpiste, semillas generalmente utilizadas para alimento de aves, y que según investigaciones anteriores, presenta un alto potencial como alimento para consumo humano.

## Limitaciones

La principal limitación en la realización del proyecto es la falta de tiempo, para la realización de todas las actividades programadas.

# FUNDAMENTO TEÓRICO

## El alpiste

El alpiste (*Phalariscanariensis*L.) es una gramínea con un ciclo de cultivo y prácticas de producción similares a las de otros cereales invernales, como el trigo (*Triticumaestivum*L.) y la avena (*Avena sativa* L.)(Robinson 1979a). El alpiste es un cereal genuino con una composición única que sugiere un potencial para uso alimentario (Cogliatti 2012). *P. canariensis* es la única especie de su género cultivadas para la producción de granos, los otros se utilizan principalmente como cultivos forrajeros (Cogliatti 2012).

## Taxonomía

El alpiste pertenece a la familia *Poaceae* (gramíneas), la subfamilia *Pooideae* y la tribu *Agrostideae* (Putnam et al., 1996).

## Descripción

El alpiste es una planta herbácea, de alrededor de 60-100cm de altura, con tallos erectos. Tiene vainas glabras, lígula obtusos 6 a 8 mm, hojas planas glabras, de 20 a 40 mm de largo por 5 a 10 mm de ancho y compactas panículas de forma ovalada que conservan la semilla con firmeza. Los frutos maduros consisten en un flósculo fértil y dos florecillas estériles basales menores. El alpiste común tiene pequeños granos elípticos con cascotes cubiertos con pelos muy finos o tricomas silíceos. La semilla del alpiste con un casco intacto es brillante y de color amarillo dorado, mientras que el alpiste descascarado es de color marrón oscuro (Parodi, 1987) (Figura 1).

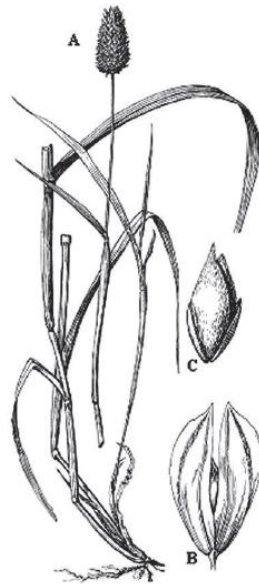


Figura 1. Ilustración de la planta Alpiste.  
Referencias: (A) panícula; (B)  
espiquillas, y (C) grano casco peludo.  
Fuente: USDA-NRCS PLANTAS base  
de datos.

## Usos

Los granos de alpiste se utilizan casi exclusivamente en la alimentación de aves, sola o mezclada con otros cereales como el mijo, semillas de girasol, linaza y otros granos de cereales (Robinson, R. 1979a.). Es ampliamente reconocido como un alimento de pájaros pequeños.

El alpiste no es seguro para el consumo humano, debido a que los cascotes están cubiertos por pequeños pelos o espículas silíceas, que pueden contaminar el molino durante el descascarado (Abdel-Aalet *al.*, 1997).

## 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 se suspende 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 monitoreado y 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 (Benitez R, *et al.*, 2008).

## SUSTRATOS

El material de partida utilizado para la obtención de los hidrolizados proteicos puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano. Entre los vegetales, los más usados son las proteínas de soja, trigo y arroz, principalmente en países desarrollados (Benítez R, *et al* 2008.).

Para la elección de una fuente proteínica adecuada debe tenerse en cuenta el uso que vaya a tener el hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al sustrato inicial. Por ejemplo, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suelen emplear colágeno y gelatina por su capacidad para formar geles transparentes (Adler-Nissen y Olsen 1979).

También se ha extendido el uso para este fin de proteínas de huevo, (Lindy Lee 1983) de carne (Smith y Brekke 1984), de sangre e incluso de cereales (Sarkkiet *al.* 1979) para este fin.

Cuando la finalidad del hidrolizado es su uso como fuente de nitrógeno, se usan proteínas de pescado y proteínas microbianas en alimentación animal, y proteínas de soja y lácteas en alimentación humana, siendo estas últimas, especialmente las proteínas del lacto-suero, la materia prima ideal para la preparación de alimentos infantiles y dietas enterales (Kong X, *et al*/2007).

## PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las hidrolasas (Guadix et al., 2000) ya que degradan las cadenas polipeptídicas de las proteínas-sustrato (Carrera, 2003), 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 (Guadix et al., 2000).

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas grado-alimenticio, respecto a su clasificación hay diversas propuestas, según su origen en: animal, vegetal, bacteriano o fúngico (Guadix et al., 2000). Hartley (1969) clasificó a las enzimas proteolíticas de acuerdo con el aminoácido o metal que posean en su sitio activo en cuatro clases;

- Serín-proteasas. Son sensibles al fosfato de fluordiisopropilo por tener un residuo de serina en su sitio activo; más del 40 % de las proteasas microbianas pertenecen a este grupo, las cuales frecuentemente son activas en una región de pH de 8 a 12, por lo que se denominan proteasas alcalinas.
- Tiol-proteasas. Tienen un residuo de cisteína en su sitio activo y son más sensibles a los agentes mercuriales como el para-cloromercuribenzoato; existen pocas proteasas de este tipo.

- Metaloproteasas. Son quelato-sensibles y tienen un átomo metálico (generalmente  $Zn^{++}$ ) como un componente esencial para su actividad proteolítica. Estas son usualmente más activas a pH neutro (proteasas neutras).
- Proteasas ácidas. Como su nombre lo indica, son activadas a pH ácido y tienen en su sitio activo un grupo carboxilato, generalmente de un residuo deaspartato.

Otra de las clasificaciones de estas enzimas es dependiendo de la naturaleza del sitio sobre el cual actúan.

- Endopeptidasas. Son aquellas enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos internos de una proteína (tripsina y quimotripsina) dando como resultado cadenas de péptidos.
- Exopeptidasas. Actúan sobre enlaces terminales de una proteína (aminopeptidasa y carboxipeptidasa), basándose en su sitio de acción sobre el nitrógeno o el carbono terminal.
- Aminopeptidasas. Actúan sobre el nitrógeno libre terminal de la cadena polipeptídica liberando un aminoácido o un dipéptido o tripéptido.
- 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 (Guadix et al., 2000).

Esta versatilidad utilitaria es explicable por la gran diversidad de enzimas proteolíticas que se conocen, su muy variada especificidad y la posibilidad de contar con proteasas activas y estables en casi en cualquier intervalo de pH y temperatura. Desde luego el grado de pureza requerida para cada uso será distinta.



## Hidrolizados proteicos

Los hidrolizados de proteínas tienen como principal aplicación ser la fuente de nitrógenos en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación de infantes y adultos enfermos. Estas dietas son diseñadas para ser absorbidas en el intestino sin digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desordenes estomacales o problemas de música intestinal, así como en lactantes con síndrome de mala absorción-malanutrición con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos (*Lebenthal/1983*).

En los hidrolizados de proteínas 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.

Las características que deben cumplir estos hidrolizados de proteínas para formar parte de una dieta enteral son:

- Deben ser osmóticamente equilibrados
- Deben ser hipoalérgicos
- Presentar un alto valor nutritivo, comparable al de la proteína de partida.
- Tener un sabor agradable (aceptable).

Para ello, la hidrólisis enzimática presenta diversas ventajas frente a la hidrólisis química, ácida o alcalina entre las que cabe destacar las siguientes:

- Selectividad: las enzimas son específicas, por lo tanto, no es frecuente la aparición de productos de degradación. En cambio, la poca selectividad de los ataques ácido y básico y su difícil control lleva a la inevitable aparición de productos de degradación que pueden llegar a ser tóxicos.

- Condiciones moderadas de temperatura y pH. La hidrólisis enzimática transcurre generalmente en el intervalo de 40°C a 60°C y pH comprendido entre 4-8.
- No se añaden sustancias extrañas. Evidentemente no es así en los procesos de hidrólisis química, ya que la necesaria neutralización posterior eleva considerablemente el contenido en sales
- Se mantiene el valor nutritivo, ya que no se produce degradación de los componentes separados, mientras que la hidrólisis alcalina destruye los aminoácidos arginina y cisteína y la hidrólisis ácida elimina el triptófano y desamina los aminoácidos serina y treonina.

No obstante, en la hidrólisis enzimática de proteínas es necesario separar o desnaturalizar la enzima y trabajar en condiciones asépticas, ya que por ser un proceso relativamente lento, puede producirse contaminación microbiana de la mezcla reaccionante. Sin embargo, la desnaturalización térmica de las enzimas (Camacho *et al.* 1992) o su separación por procesos de membrana son temas resueltos por la tecnología actual y la necesidad de asepsia es una característica general de la industria alimentaria.

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 y por último, hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada (Benítez R.*et al.*, 2008).

## Mecanismo 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 en la Figura 2.

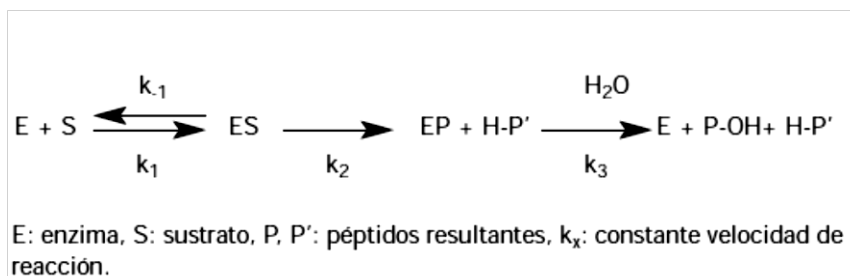


Fig.2 mecanismo catalítico de una proteasa (Adler-Nissen 1993).

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 en la Figura 3.

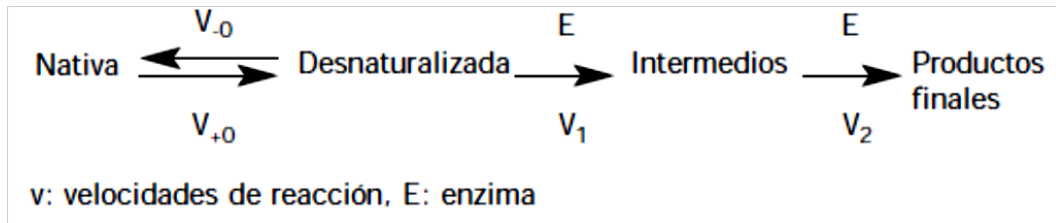
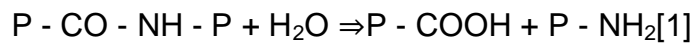


Fig.3 Teoría de Linderstrøm- Lang(Whitaker 1994).

La proteasa actúa sobre el enlace peptídico, rompiéndolo, y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo según la siguiente ecuación:



Los grupos amino y carboxilo formados tras la hidrólisis pueden estar parcialmente ionizados, dependiendo del pH del proceso de hidrólisis, y según los siguientes equilibrios:



Se estiman que los valores de pK a 25°C para los grupos  $-COOH$  y  $+H_3N-$  en polipéptidos están comprendidos entre 3.1-3.6 y 7.5-7.8 respectivamente (Steinhardt y Beychok 1964; Rupley 1967). Por lo que para  $pH < 3.1-3.6$ , el grupo ácido estará parcialmente dissociado y el grupo amino totalmente protonado. Si se deja incontrolado el pH en esta zona aumenta rápidamente. Si se trabaja a  $pH > 7.5-7.8$ , el grupo carboxilo estará totalmente dissociado y el amino parcialmente protonado, lo que conlleva una disminución continua del pH (Guadix A. *et al.* 2000).

Debe tenerse presente además que la hidrólisis proteolítica no es una sola reacción, sino que se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio, lo que da una gran complejidad estos tipos de procesos (Guadix A. *et al.* 2000).

## CONDICIONES DE LA HIDRÓLISIS

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 y el 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 (Adler-Nissen, 1986). 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-staten* el cual el pH se fija en el valor deseado.

## Caracterización del hidrolizado

Debido a la hidrólisis, las propiedades moleculares de las proteínas cambian, produciéndose la disminución del peso molecular, el aumento de la carga y la liberación de grupos hidrofóbicos, entre otros fenómenos (Caessens, et al. 1999) Estos cambios moleculares pueden ser detectados con varios métodos analíticos, los cuales reflejan una o varias propiedades fisicoquímicas de las moléculas (Fig. 4).

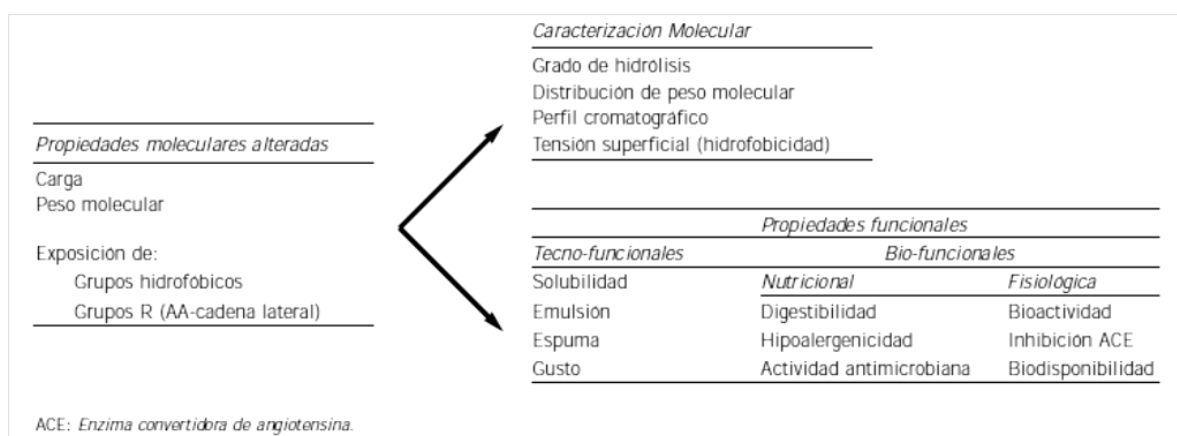


Fig.4 cambios en las características de las proteínas debido a la hidrolisis.

Como resultado de los cambios moleculares, las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas (Fig. 4). Aunque el término propiedad funcional, con frecuencia se aplica solamente para indicar propiedades tecno-funcionales de los hidrolizados, esto debería también abarcar propiedades bio-funcionales, las cuales pueden ser subdivididas en nutricionales y fisiológicas o funcionalidad biológica (Mahmoud, 1984). Las propiedades nutricionales de la hidrólisis reflejan por ejemplo su digestibilidad aumentada y alergenicidad disminuida cuando se las compara con las proteínas parentales. Las propiedades fisiológicas abarcan bio-actividades potenciales del hidrolizado, las cuales se originan de la liberación de péptidos bioactivos. Finalmente, las propiedades tecno-funcionales representan funcionalidad tecnológica, tales como solubilidad, propiedades emulsificantes y espumantes (Fig. 4).

El parámetro más usado para describir el resultado de un proceso de hidrólisis es el grado de hidrólisis (DH). Otro parámetro importante para la hidrólisis de proteína es la distribución del peso molecular de los péptidos en los hidrolizados. Para esto se emplean técnicas como SDS-PAGE (Galvao *et al*, 2001) o cromatografía de exclusión por tamaño (Tayyab S.*et al*, 1992, Lin SB., *et al.*, Sli<sup>h</sup>y<sup>t</sup>a<sup>´</sup>R, et al 205). Estas técnicas se usan frecuentemente para comparar la acción hidrolítica de varias proteasas, o para caracterizar hidrolizados hipo alergénicos. Finalmente, los hidrolizados se caracterizan ocasionalmente mediante cromatografía de fase reversa (Tayyab S.*et al*, 1992, Galvao *et al*, 2001) la cual detalla campos de información acerca de la complejidad de los hidrolizados. Sin embargo, la comparación directa de hidrolizados es difícil con los perfiles que determina esta Técnica cromatográfica (Kim SB et al, 2004). A continuación se describen las ventajas y limitaciones de los métodos más usados en la hidrólisis de proteínas para el control del proceso y caracterización de los hidrolizados obtenidos.

#### *DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA*

Cuando se requiere determinar la actividad proteolítica de una enzima, uno de los ensayos más empleados es el método de Anson. En este método, se hidroliza hemoglobina desnaturalizada con la proteasa deseada a pH 7.5, temperatura de 25 °C durante 10 min. La hemoglobina que no se hidrolizó se precipita con ácido tricloroacético (TCA) y al sobrenadante, después de filtrado, se le añade reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu que produce una coloración azul con tirosina, triptófano y en menor grado con cistina, cisteína e histidina. La absorbancia se mide a 750nm. Para obtener la línea de calibrado se utiliza una proteasa de actividad Anson conocida, usualmente tripsina pancreática, que se somete al mismo ensayo que la proteasa problema (Novo industrias 2001).

## *GRADO DE HIDRÓLISIS*

El grado de hidrólisis es el parámetro clave para el seguimiento y control de las reacciones de hidrólisis de proteínas. Representa la proporción de enlaces peptídicos hidrolizados sobre el número total de enlaces. Se calcula de acuerdo con la ecuación 1, donde  $h$  es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y  $h_{tot}$  el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa. Ambos  $h$  y  $h_{tot}$  son expresados en meq/g (Adler-Nissen 1994).

$$DH = (h/h_{tot}) \cdot 100\% [1]$$

Los métodos para medir el DH se basan en: la determinación de los grupos  $\alpha$ -amino libres, la determinación de nitrógeno soluble tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético y la valoración del protón liberado tras la ruptura de un enlace peptídico a determinados valores de pH.

## *DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS $\alpha$ -AMINO LIBRES*

La cantidad de grupos  $\alpha$ -amino liberados puede ser medida usando reactivos que reaccionen específicamente con grupos amino, produciendo derivados que pueden ser detectados espectrofotométricamente. Para ello puede utilizarse la valoración con formol (A.O.A.C. 2005), aunque el gran número de interferencias que presenta este método lo desaconsejan en el caso de los hidrolizados de proteínas. También se utilizan reactivos como ninhidrina, ortoftaldialdehído (OPA) y ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS), que reaccionan con los grupos amino libres.

La técnica más antigua es la de reacción con ninhidrina, de gran sensibilidad, que presenta el inconveniente de la larga duración de los ensayos y la interferencia del amonio, además de dar como resultado valores mucho más bajos de DH, cuando se comparación OPA y TNBS, los cuales correlacionan bien (Panasiuk R 1998).

El método del TNBS (Adler-Nissen), que se basa en la reacción de grupos amino primarios con el ácido trinitrobenzenosulfónico, ha sido utilizado por diferentes autores para el análisis de hidrolizados de proteínas (Camacho F, *et al* 1992). Después de la incubación de las muestras con tiempos entre 15 y 60 minutos y a temperaturas entre



30 y 50 °C se mide la absorbancia a 420nm. Entre los inconvenientes de este método pueden mencionarse la inestabilidad del reactivo, el riesgo de explosión, el alto valor de los blancos, la contaminación del reactivo con ácido pícrico, la interferencia de azúcares reductores y amonio, la no reactividad de prolina e hidroxiprolina así como la alteración de los resultados por la reacción de los grupos  $\alpha$ -amino de lisina con el reactivo. Algunos autores prefieren el método de la OPA al método de TNBS tanto por su rapidez como por su seguridad. Sin embargo, estos autores midieron el derivado de la OPA por absorción UV inmediatamente después de la adición de los reactivos. Posteriores investigaciones demostraron que la absorción de la OPA fue estable solamente durante 20 min. Además, este método tiene el inconveniente de no reaccionar con prolina y sólo parcialmente con cisteína (Panasiuk R, *et al* 1998).

## DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO SOLUBLE

En este caso las técnicas más usuales son el método Kjeldhal, la reacción de Biuret o la determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos con grupos aromáticos. En este laboratorio se ha empleado el método de *Dumas*, que consiste en la oxidación del compuesto con CuO, con lo que el nitrógeno de la muestra pasa a nitrógeno gas (N<sub>2</sub>), midiéndose el volumen desprendido, con buena correlación contra otros métodos espectrofotométricos (Panasiuk R, *et al* 1998, A.O.A.C. 2005)

## DETERMINACIÓN DE LOS PROTONES LIBERADOS MEDIANTE POTENCIOMETRÍA

Algunos autores monitorean el DH adicionando una base (o un ácido, dependiendo del pH inicial de la hidrólisis), para mantener el pH de la hidrólisis constante. La cantidad de base empleada es proporcional al DH. Sin embargo, este consumo no está relacionado de una forma simple con el grado de hidrólisis alcanzado, siendo necesario para establecer esta relación el conocimiento del pK medio de los grupos  $\alpha$ -amino liberados en la hidrólisis (Adler-Nissen 1986, (Camacho F, 2001). El método sólo es

aplicable a la hidrólisis enzimática de proteínas a pH neutro, alcalino o fuertemente ácido ( $\text{pH} \leq 3$ ) y puede ser realizado de forma sencilla y precisa (Adler-Nissen 1986).

## DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN APARENTE DE PESO MOLECULAR

Una vez determinado el DH, puede estimarse la distribución y el promedio de la longitud de la cadena (PCL) de los hidrolizados (ecuación 2), asumiendo que todos los hidrolizados son solubles (Adler-Nissen 1986).

$$\text{PCL} = 100/\% \text{DH} [2]$$

La longitud de la cadena peptídica está relacionada con el promedio del peso molecular de los péptidos en los hidrolizados. Sin embargo, los hidrolizados con PCL similar podrían tener péptidos de distribuciones de peso molecular sustancialmente diferente.

La distribución de tamaños de los péptidos de un hidrolizado puede ser útil para predecir la capacidad antigénica del mismo, así como para mostrar diferencias en la actuación de distintos pretratamientos del sustrato o enzimas utilizadas. Normalmente se utilizan métodos cromatográficos o electroforéticos para este fin.

La electroforesis en gel, SDS-PAGE (gel de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida) ha sido la técnica más utilizada para la caracterización de hidrolizados y proteínas a pesar de sus limitaciones en la separación de péptidos de peso molecular bajo (Caessens et al., 1999). La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) con columnas de Sephadex G-25 o G-50, ha sido el método elegido por diferentes autores. En este método las moléculas son separadas principalmente con base al volumen hidrodinámico, el cual depende del tamaño y conformación de las moléculas. Desafortunadamente, la separación también está influenciada por interacciones no específicas entre componentes proteínicos y el material de la columna, como interacciones ión-hidrofóbico. Estas interacciones dependen de la elección de eluentes y del material de la columna (Tossavainen et al., 1997, Smyth M et al., 1997, Fujinari et al., 1997). El efecto de las interacciones no específicas en el cálculo aparente de la distribución de tamaño molecular (MWD) puede ser reducido por inclusión de un gran

número de péptidos para calibración que difieren en sus propiedades moleculares. Sin embargo, el método que mejores resultados ha dado, por su mayor resolución y más fácil cuantificación, ha sido la cromatografía líquida de exclusión, SE-HPLC, con columnas de gel TSK (Zu R et al., 2008).

Otro método cromatográfico, a menudo usado en los análisis y separación de proteínas hidrolizadas, es la cromatografía de fase reversa (RPC). La característica más importante para la separación en RPC es la diferencia en hidrofobicidad entre aminoácidos. Para péptidos pequeños (<15 residuos), la hidrofobicidad de las cadenas de aminoácidos en los péptidos determina el tiempo de elución de la columna de fase reversa (Qi W et al., 2003, Soares et al., 2004, Hearn et al., 1988). Sin embargo, para péptidos grandes, la longitud del péptido también influye en el tiempo de retención (Hearn et al., 1988, Chabanet C et al., 1992). Generalmente, la resolución de la cromatografía en fase reversa es mejor que la de la cromatografía de exclusión. Sin embargo es más difícil relacionar los resultados con las propiedades moleculares de los hidrolizados, pues varias características, como la longitud de los péptidos, la composición de aminoácidos y la presencia de áreas hidrofóbicas influyen en el tiempo de retención y por tanto en el perfil cromatográfico.

## SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS Y AMINOÁCIDOS

Una correcta separación e identificación de los péptidos de un hidrolizado de proteínas complementaría la información dada por la determinación del grado de hidrólisis y la distribución en pesos moleculares, y ayudaría a un mejor conocimiento de la composición del producto.

La electroforesis (SDS-PAGE) y los distintos métodos cromatográficos (fase reversa, RP-HPLC; exclusión, SE-HPLC; filtración en gel, cambio iónico) han sido las técnicas más empleadas en la separación de péptidos y aminoácidos, mientras que para la identificación de los mismos, después del fraccionamiento, se ha utilizado generalmente espectrometría de masas, cromatografía de gases, análisis de secuencias o determinación de aminoácidos (Uhlig H.1993, Slì y` t` a` R 2005). Lemieux y Amiot (Lemieux L et al., 1989, Lemieux L et al., 1990) evaluaron las distintas técnicas

empleadas para la separación de péptidos, concluyendo que la cromatografía líquida de exclusión, SE-HPLC, es la técnica que mayor información aporta sobre la composición del hidrolizado, ya que es el volumen molecular el criterio de separación empleado, y no el estado de ionización, la carga o la hidrofobicidad de los péptidos como en otras técnicas, que no obstante pueden ser complementarias. También pusieron de manifiesto la ineficacia de los distintos métodos en la separación de péptidos de peso molecular inferior a 1.000 Da. En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas capaces de separar y cuantificar los péptidos de PM inferiores a 1.000 Da puede ser importante, especialmente si el hidrolizado se va a utilizar en la formulación de dietas enterales, en cuyo caso debe estar constituido fundamentalmente por di- y tripéptidos (Lemieux L et al., 1989, Lemieux L et al., 1990)).

## PROPIEDADES TECNO-FUNCIONALES

Los cambios de las características moleculares que ocurren durante la hidrólisis de la proteína pueden dar lugar al comportamiento tecno-funcional modificado del hidrolizado cuando se lo compara con la proteína intacta, por ejemplo solubilidad alterada, viscosidad, características sensoriales, emulsión y características de la espuma (Caessens et al., 1999, Jayaprakasha et al, 2005).

### SOLUBILIDAD

En el punto isoeléctrico (pI) 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 (Caessens et al., 1999, Slattery H, et al., 1998). El efecto de la hidrólisis sobre la solubilidad a otros valores de pH depende de la proteína estudiada. Los caseinatos por ejemplo, son muy solubles en los valores de pH sobre y debajo del pI (pH 4-5) (Svenning et al., 1998). Para la proteína del suero, que es algo menos soluble que la caseína, excepto en el pI, se ha observado un aumento de solubilidad con hidrólisis en la gama entera de pH (Wasswa J et al., 2007, Kim et al., 2008)

## 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 (Adler-Nissen et al., 1979). Se ha demostrado que el sabor amargo de los péptidos puros, a pesar de depender de la fuente de proteína y de la especificidad de la enzima, está relacionado con la presencia y posición de aminoácidos hidrofóbicos en los péptidos del hidrolizado. (Li L, et al., 2008, Humiski et al 2007). Se han propuesto varios métodos analíticos para predecir el sabor amargo de los hidrolizados. Adler-Nissen (Adler-Nissen 1986) 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. También se han utilizado parámetros químicos (Frister et al., 2000) y a través de la espectroscopía infrarroja (Sorensen et al., 1998) podría predecirse el grado de amargor.

## EMULSIONES 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. Chobert (Chobert et al., 1988), divulga la mejora en la emulsión y formación de espuma para los hidrolizados trépticos de la caseína, que está de acuerdo con los resultados encontrados por otros autores. La formación y estabilización de la espuma y las emulsiones deben ser medidas por separado (Yin S et al., 2008, Paraman et al., 2007, Govindaraju et al., 2007 Martinez et al., 2005). Dentro de las técnicas, se determinan el índice de actividad de la emulsión (EAI) que mide la turbiedad de las emulsiones con cierta fracción de aceite, mientras que la capacidad de emulsionar (EC) determina la cantidad de aceite que se puede dispersar por cierta cantidad de proteína o de 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 (Wang et al., 2006).

## PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

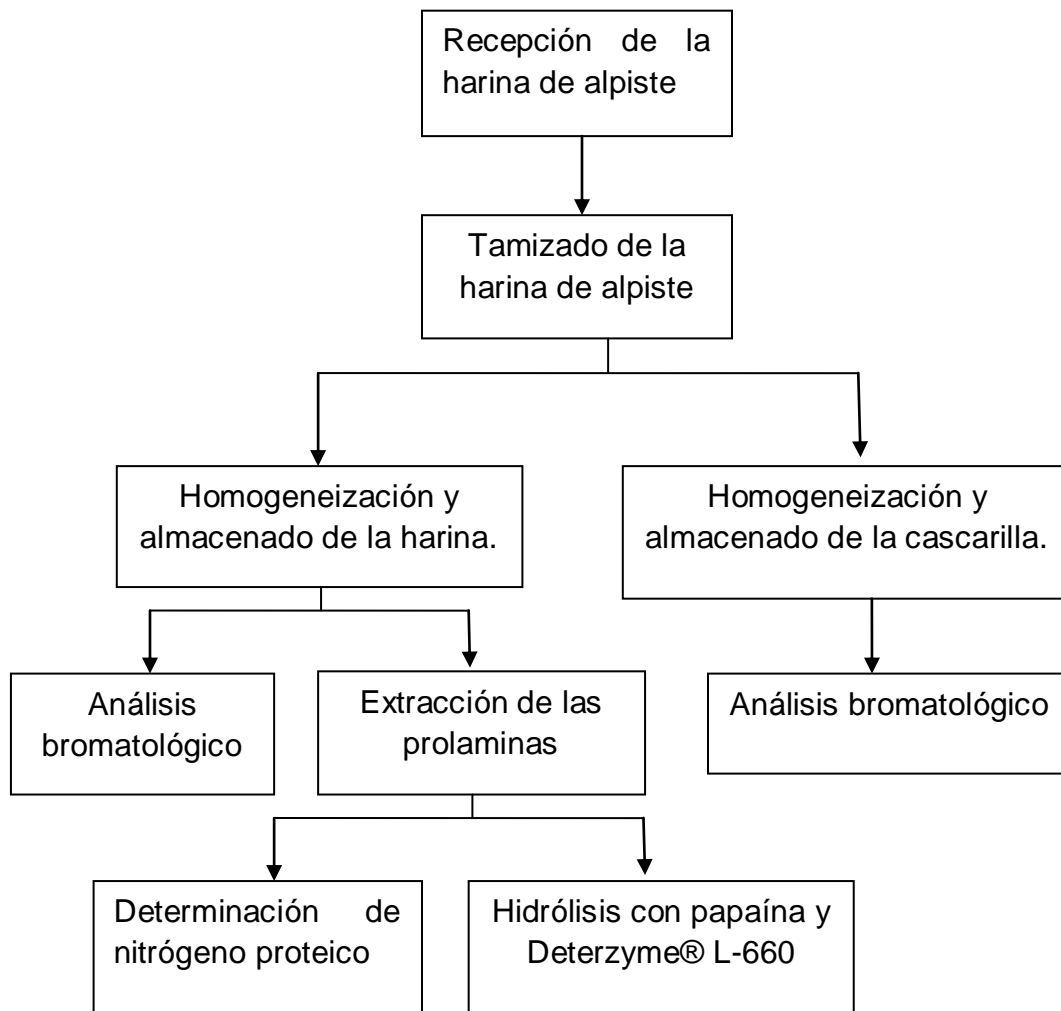


Diagrama de bloques de las actividades desarrolladas.

## CARACTERIZACIÓN DE LA HARINA DE ALPISTE (*Phalaris canariensis*)

### PREPARACION DE LA MUESTRA

La harina de alpiste fue tamizada en mallas de la marca FiiCSA, para separar la harina de la cascarilla.

La harina y la cascarilla tamizadas se almacenaron por separado en bolsas de cierre hermético y se mantuvieron a temperatura ambiente.

### ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

A la harina y a la cascarilla de alpiste se les realizaron determinaciones de:

- Humedad
- Cenizas
- Grasas
- Proteína
- Fibra cruda
- Carbohidratos

Cada determinación se realizó por triplicado siguiendo las técnicas descritas en los anexos.

### EXTRACCIÓN DE LAS PROLAMINAS

- Para la extracción de las prolaminas de la harina de alpiste se empleó etanol al 70% p/p adicionando 0.35% p/p de hidróxido de sodio y 0.5% p/p de metabisulfito de sodio, la mezcla se usó en una relación 1:5 p/p con respecto al peso de la harina de alpiste (Carter y Reck, 1970). Esta mezcla se llevó a 70 °C y se mantuvo en estas condiciones por una hora con agitación constante. El sobrenadante se centrifugó a 1000 g por 5 minutos (Ferreira-García et al., 2010). Se evaporó el sobrenadante en un roto-vapor (HEIDDOLPH modelo LABOROTA 4000), para la eliminación del etanol, las prolaminas extraídas se almacenaron a temperatura ambiente en un frasco cerrado herméticamente.

## Determinación de nitrógeno proteico

La determinación de nitrógeno proteico en las prolaminas extraídas de la harina de alpiste se realizó de acuerdo al método 2.057. Establecido por la AOAC. 1980, descrita en los anexos.

## HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

Técnica del pH-stat (autor, año)

Esta técnica monitorea el curso de la reacción en la que cada enlace peptídico es hidrolizado por la enzima. El pH-stat evalúa el progreso de la hidrólisis por titulación de los grupos amino liberados con una solución alcalina. Las enzimas trabajan a pH y temperatura constante durante todo el proceso.

Un sistema automatizado del método de pH-stat proporciona una medición directa del porcentaje de enlaces peptídicos hidrolizados, el grado de hidrólisis (DH). El DH se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$DH = \frac{B \cdot N_B \cdot 1/\alpha}{MP \cdot h_{tot}} \cdot 100$$

Dónde:

B= volumen de la base consumida

$N_B$ = normalidad de la base

$1/\alpha$ = grado medio de disociación de los grupos  $\alpha$ -amino (tabla 1. Anexos)

MP= cantidad de proteína en la mezcla de la reacción (gramos)

$H_{tot}$ = suma de los milimoles de amino por gramo de proteína asociada (tabla 2. Anexos).

La hidrólisis de la proteína se realizó en un vaso termo regulable en el que se colocaron 1gr de sustrato en 100ml de agua desionizada, se ajustó a temperatura y pH deseados y se mantuvo en esas condiciones por un periodo de media hora, para cerciorarse de que no hubiesen variaciones de pH y temperatura antes de agregar la enzima, la temperatura era controlada usando un recirculador de agua marca Polyscience, el pH fue monitoreado mediante un electrodo y controlado con una solución de NaOH 0.1N,



contenida en una probeta graduada para realizar las respectivas lecturas de su consumo, adicionada mediante de una bomba peristáltica en una bio-consola marca applikon, la agitación suave fue provista por un agitador magnético, además para evitar la pérdida de líquido por evaporación se conectó un condensador que se mantuvo a temperatura ambiente.

La adición de la enzimas se realizó a través de un orificio en la tapa del vaso enchaquetado, la papaína mediante un embudo, y el Deterzyme® L-660 con una micro pipeta.

## RESULTADOS

### Tamizado

El tamizado se realizó para determinar el número de malla necesario para separar la harina de la cascarilla, se emplearon una serie de tamices colocados de manera ascendente y se colocaron en el vibrador durante 15 minutos

No. tamiz	Muestra retenida
60	39.583g
70	54.4129g
80	3.4120g
100	0.4078g
120	0.1530g

El tamizado se realizó con una muestra inicial de 100g, después del tamizado se pesaron las cantidades de harina y cascarilla retenida en cada uno de los tamices, en el tamiz No. 60 se retuvieron 39.583g de cascarilla, el resto de la muestra, en esta caso harina quedó distribuida en los tamices como se muestra en la tabla 1. Finalmente se obtienen 58.3857g de harina libre de cascarilla dando un total de 97.9687g, el faltante de muestra se debe a pérdidas de a harina en los tamices, debido a que esta queda atrapada en las orillas de las mallas.

Una vez conocidos los tamices necesarios, en este caso el tamiz número 60 para retener la cascarilla se tamizó el resto de la harina para que posteriormente se realizara el análisis bromatológico.

## Caracterización de la materia prima.

Se caracterizaron la harina y la cascarilla de alpiste (*Phalaris canariensis*) después de realizar el tamizado.

En el caso de la cascarilla, las espículas de sílice no fueron eliminadas, por lo cual estas se encuentran presentes en todas las determinaciones realizadas, es posible que también la harina halla sido contaminada con las espículas durante la molienda y/o tamizado.

La composición química de la harina obtenida de alpiste, (Cuadro 1) fue similar a la reportada por Abdel-Aal *et al.* 1997.

El contenido de proteínas fue más alto que el reportado para otros cereales comunes, como cebada (10-17%), avena (13%) o trigo (8.5-15%) (Gutiérrez-Á *et al.* 2008., Kirk, R. *et al.*, 1999, Quinde, Z. *et al.*, 2004).

Cuadro 1. Composición química (%BS ± DE) de la harina y cascarilla de alpiste

COMPONENTE	HARINA	± DE	CASCARILLA	±DE
CENIZAS	3.68%	0.00052	12.33%	0.00069
GRASAS	7.46%	0.00291	4.64%	0.00110
FIBRA CRUDA	5.74	0.00712	7.23%	0.00032
PROTEÍNAS*	18.21%	0.00664	23.91%	0.00394
CARBOHIDRATOS	64.90%	0.00272	51.89%	0.00483
HUMEDAD	6.45%	0.00053	6.85%	0.00116

\*N x 5.70; BS, base seca; DE, desviación estándar.

## Extracción de las prolaminas

En la extracción de las prolaminas se obtuvieron en promedio 8.6g de prolamina por cada 100g de harina de alpiste. El porcentaje de extracción fue bastante bajo, en comparación con los datos reportados por otros autores de extracción de prolaminas de otras especies de granos (Ferreira *et al.*, 2010).

A las prolaminas extraídas se les hizo una determinación de nitrógeno proteico, del resultado fue que contenían un 14.98% de nitrógeno proteico, que al multiplicarlo por 6.25 nos da un contenido de proteínas de 93.625%.



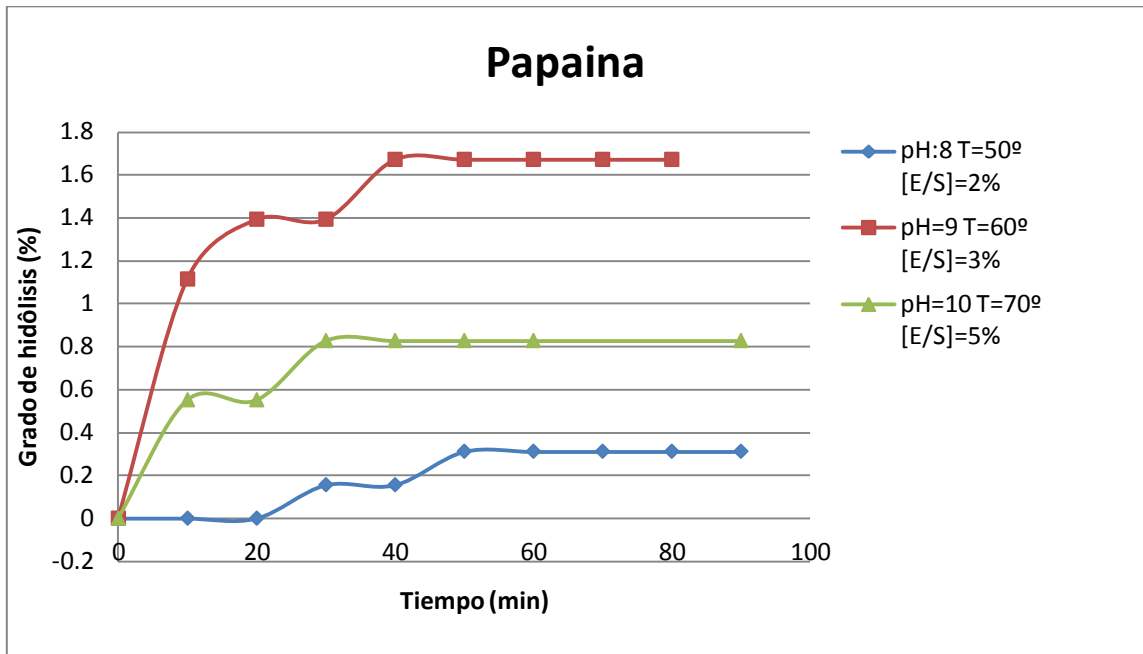
Fig.5 Prolaminas extraídas.

El uso de metabisulfito de sodio como agente reductor, se aplicó por que permite que las uniones disulfuro de las cisteínas presentes en las prolaminas se rompan, permitiendo una mayor disponibilidad de aminoácidos.

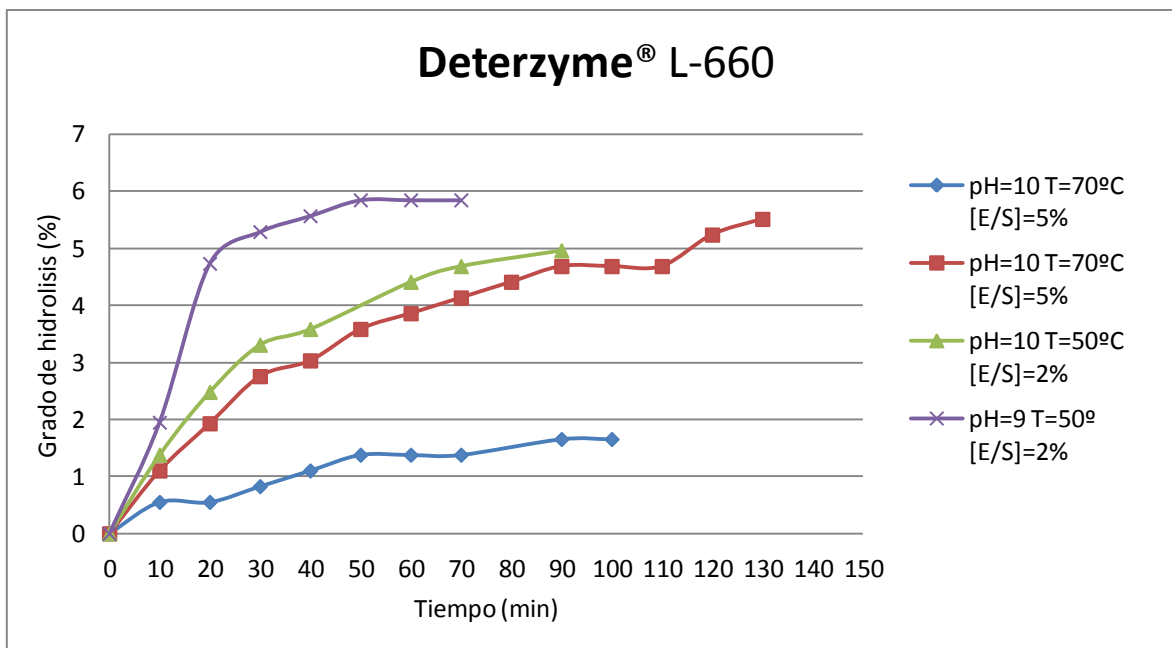
Las proteínas obtenidas son de color amarillo, aspecto de goma, sin ningún olor en particular, excepto el del etanol, con el cual fueron extraídas.

Una vez obtenidas las prolaminas se procedió a las pruebas de hidrólisis enzimática.

## Hidrolisis enzimática



Grafica 1. Cinética de hidrolisis de prolaminas realizada con papaina.



Grafica 2. Cinética de hidrolisis de prolaminas realizada con Deterzyme® L-660.

El estudio no se desarrolló bajo un diseño experimental, las gráficas (1 y 2) de la página anterior son el resultado del promedio de realizar cada hidrolisis por duplicado, es decir dos corridas por experimento. Por ello, en este caso no se incluye una desviación estándar.

Para el cálculo de la hidrolisis se empleó la siguiente formula:

$$DH = B \cdot N_B \cdot 1/\alpha \cdot 1/MP \cdot 1/h_{tot} \cdot 100$$

Dónde:

B= volumen de la base consumida

$N_B$ = normalidad de la base

$1/\alpha$ = grado medio de disociación de los grupos  $\alpha$ -amino (tabla 1. Anexos)

MP= cantidad de proteína en la mezcla de la reacción (gramos)

$H_{tot}$ = suma de los milimoles de amino por gramo de proteína asociada (tabla 2. Anexos).

En la hidrolisis con papaína (gráfica 1.) se observa que el grado de hidrolisis después de mostrar un comportamiento exponencial al llegar a los 30 minutos se mantiene constante en los tres casos, además de que el grado de hidrolisis máximo alcanzado es muy bajo, esto puede ser un indicio de que la papaína no es una buena opción para hidrolizar la prolaminas.

En la hidrolisis con Deterzyme® L-660 (gráfica 2.) se observa que la disminución de la temperatura favorece a la hidrolisis, ya que a pesar de que la concentración de enzima con respecto al sustrato también se reduce el grado de hidrolisis aumenta en el transcurso del tiempo, la diferencia más marcada puede observarse en las curvas a) y d) (gráfica 2.) en las cuales la diferencia de temperaturas es muy notable al igual que la concentración de enzima, que a pesar de que en la curva a) es mayor que en la curva b) el grado de hidrolisis alcanzado es mayor desde el inicio de la reacción que de igual manera va regresando positivamente con el tiempo.

En la curva d) la diferencia del grado de hidrolisis y los tiempos en los que se alcanzaron son notoriamente diferentes del resto de las demás pruebas, se observó que

en el minuto 30 el grado de hidrolisis es mayor que el mas alto reportado en las demas pruebas en tiempos mas prolongados esto nos indica que no necesariamente se requiere de temperaturas muy elevadas para obtener buenos resultados.

Respecto a las soluciones resultantes no se realizaron los analisis correspondientes como son la determinacion de proteinas y las propiedades funcionales, unicamente se hizo la observacion de las soluciones resultantes que en el caso de la hidrolisis con papaina aun se observan restos de la proteina, caso contrario de la hidrolisis con Deterzyme® L-660 que se obtuvo una solucion traslucida sin solidos visibles.

En la hidrolisis realizada con papaína (Gráfica 1) se observa que el incremento de pH afectan negativamente al desarrollo de la hidrolisis,

En la hidrolisis con Deterzyme® L-660, descrita en la Fig. 4 Se observa que la disminución de la temperatura favorece la hidrolisis, pues a pesar de que la concentración de enzima empleada también se reduce, el grado de hidrolisis aumenta con el tiempo, la diferencia más clara se observa entre las curvas a) y b) en las cuales las diferencias de temperaturas son muy notables así como la concentración de la enzima, que a pesar de que la concentración en a) es mayor que en b) el grado de hidrolisis es mayor desde el inicio de la reacción así como en el incremento a través del tiempo.

En la curva d) la diferencia del grado de hidrolisis y los tiempos en los que se alcanzaron son notoriamente diferentes del resto de las demás pruebas, se observa que al minuto 30 el grado de hidrolisis es mayor que el más alto reportado en cualquiera de las otras pruebas en tiempos más prolongado, esto nos indica que la hidrolisis no necesariamente requiere de pH y temperaturas elevadas para obtener buenos resultados, así tenemos ahorro de energía tiempo y mejores resultados.

Respecto a las soluciones resultantes se observa que en la hidrolisis con papaína, se observa que la proteína sigue apareciendo casi intacta en la solución (fig. 7 Anexos) n, sin embargo en la hidrolisis con Deterzyme se observa que esta se desintegró completamente (fig.8.anexos), lo cual también da un indicio de su efectividad para hidrolizar las prolaminas



## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusión.

En el análisis bromatológico puede observarse que el contenido proteico de la harina del alpiste es similar o mayor a la de otros granos de consumo humano, como la avena *sativa* reportada por Apráez-Guerrero et al., 2012 (tabla 3. En anexos), lo cual indica su potencial para emplearse en la dieta humana.

La hidrolisis de las prolaminas se desarrolla con mayor eficiencia con la enzima comercial Deterzyme® L-660 en un medio ligeramente alcalino, con temperatura moderadamente alta, esto se refleja positivamente en un ahorro de energía y tiempo durante la hidrolisis.

### RECOMENDACIONES

Es necesario realizar un análisis en las propiedades funcionales de las prolaminas antes y después de la hidrolisis, así como la caracterización del hidrolizado proteico para determinar el contenido amídico para su aplicación en la alimentación.

A la técnica de la extracción de las prolaminas puede aumentársele también, y extraídas las prolaminas, la extracción de grasas empleando un solvente, para tener una mayor pureza.

En el caso de las prolaminas, la hidrólisis no se recomienda realizarla con endoproteínas, como es el caso de la papaína, ya que en el experimento es muy notoria su baja eficacia medida en tiempo y concentración de enzima empleada.

## ANEXOS

### HUMEDAD

Pesar con precisión de 1 mg, aproximadamente 5 g de muestra en capsula de porcelana, previamente preparada según método número 1.

Introducir la capsula de porcelana en la estufa a 130°C ±1°C y destapar. Mantener en la estufa durante una hora y treinta minutos. Tapar la capsula de porcelana antes de sacar de la estufa y dejar enfriar a temperatura ambiente en desecador y pesar a continuación.

### Cálculos

La humedad de la muestra expresada en tanto por ciento vendrá dada por la siguiente fórmula:

$$H\% = \frac{P_1 - P_2}{P} * 100$$

Siendo:

P1 = Peso, en g, de la capsula de porcelana con la muestra.

P2 = Peso, en g, de la capsula de porcelana con la muestra desecada.

P = Peso, en g, de la muestra.

La diferencia resultante entre determinaciones duplicadas de la misma muestra no deberá ser mayor de 0,1% en valor absoluto.

### CENIZAS

Pesar con precisión de 1 mg de 2 a 6 g de muestra preparada según el método oficial número 1, en un crisol previamente incinerado y tarado. Colocar el crisol y su contenido sobre una placa calefactora, teniendo cuidado de que la combustión no sea demasiado rápida, de manera que no haya pérdidas de materia sólida por proyección. Llevar a continuación el crisol a la mufla (550 ±10°C) hasta combustión completa de la sustancia (cenizas blancas o grises).

Enfriar a temperatura ambiente en un desecador. Pesar seguidamente.

## ANEXOS

### Cálculos

El contenido en cenizas sobre sustancia natural vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$\%Cenizas = \frac{P_1 - P_2}{P} * 100$$

Siendo:

P1 = Peso, en gramos, del crisol con las cenizas.

P2 = Peso, en gramos, del crisol vacío.

P = Peso, en gramos, de la muestra.

El contenido en cenizas sobre sustancia seca vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$\%Cenizas = \frac{C * 100}{100 - H}$$

Siendo:

C = % de cenizas obtenidas en sustancia natural

H = Humedad.

Referencias AOAC, edición 1980, 14.006.

### GRASAS

Pesar, con precisión de 1 mg, aproximadamente 10 g de muestra en un matraz de 250 a 300 ml. Agitando continuamente añadir 100 ml de ácido Clorhídrico 3N, añadir unas perlas de vidrio cerrar con tapón de vidrio que no ajuste herméticamente o vidrio de reloj. Hervir unos sesenta minutos, agitando de vez en cuando, enfriar y filtrar sobre filtro previamente humedecido. Lavar el precipitado con Agua hasta que el filtrado no dé precipitado con Plata Nitrato o no dé reacción ácida de Papel de Tornasol. Poner el filtro en una cápsula y secar en estufa a 100°C ±1°C.

## ANEXOS

El filtro ya seco se introduce en un cartucho para extractor tipo Soxhlet y se tapa con algodón desengrasado.

El cartucho se coloca en el extractor y se vierte el éter de petróleo dejándolo sifonar unas ocho horas. El matraz receptor debe estar seco y tarado.

Evaporar el solvente, secar en estufa y pesar.

Cálculos.

El contenido de grasa en sustancia natural vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$\%Grasas = \frac{P_1 - P_2}{P} * 100$$

Siendo:

P1 = Peso, en gramos, del matraz con la grasa.

P2 = Peso, en gramos, del matraz vacío.

P = Peso, en gramos, de la muestra.

El contenido de grasas en sustancia seca vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$\%Grasas = \frac{G * 100}{100 - H}$$

Siendo:

G = Porcentaje de grasa obtenida en sustancia natural

H = Humedad.

Referencias. AOAC, edición 1980, 14.059.

## ANEXOS

### PROTEÍNA (Johann Kjeldahl, 1883)

Pesar, con la precisión de 1 mg, aproximadamente 0.5-2.5 g de muestra, introducirla en el matraz Kjeldahl. Añadir unos 5 g de mezcla catalítica de selenio, 20 ml de Ácido Sulfúrico 96%. Poner a digerir en mantas eléctricas, teniendo cuidado al principio de no elevar demasiado la temperatura hasta que cese el desprendimiento de la espuma (añadir si fuera preciso una pequeña cantidad de parafina). Digerir hasta que la solución esté clara.

Enfriar, diluir, añadir unas gotas de Fenolftaleína solución 1% y conectar el aparato destilador añadiendo Hidróxido de Sodio al 40% hasta viraje.

En el matraz receptor poner 100 ml de Acido

Bórico solución 4 con unas gotas de indicador Tashiro cuidando que el extremo del refrigerante quede bien cubierto del líquido.

Mantener la destilación aproximadamente 15 minutos (o más, si es preciso, hasta que no dé reacción básica); lavar el extremo del refrigerante y titular el destilado con Ácido Clorhídrico 0,1N.

Hacer un blanco.

#### Cálculos

El contenido de proteínas en materia natural vendrá dado por la siguiente fórmula:

$$\%Proteinas = \frac{0.14 * F(V_1 - V_0)}{P}$$

Siendo:

V1 = Volumen, en ml, de ácido clorhídrico 0,1N utilizado en la determinación.

V0 = Volumen, en ml, de ácido clorhídrico 0,1N utilizado en blanco.

P = Peso, en gramos, de la muestra.

F= Factor de conversión (5.70)

El contenido en proteínas en materia seca vendrá dado por la siguiente fórmula:

## ANEXOS

$$\%Proteínas = \frac{p * 100}{100 - H}$$

Siendo:

p = % proteína obtenida en sustancia natural

H = Humedad.

Referencias AOAC (1980) 2.057.

### FIBRA BRUTA (CRUDA)

Pesar, con precisión de 1 mg, de 1 a 3 g de muestra y añadir 200 ml de Ácido Sulfúrico 0,26 N y unas gotas de Silicona líquida antiespumante. Llevar a ebullición y mantenerla durante treinta minutos en un sistema de refrigeración a reflujo. Transcurridos los treinta minutos filtrar sobre el crisol previamente incinerado y lavar el residuo con Agua desionizada caliente hasta que no dé reacción ácida.

Transferir cuantitativamente el residuo a un matraz adaptable al sistema de reflujo, añadir 200 ml de solución de Potasio Hidróxido 0,23N y unas gotas de antiespumante. Llevar a ebullición y dejar hervir durante treinta minutos. Filtrar sobre el crisol filtrante y lavar con desionizada caliente hasta que no dé reacción alcalina. Deshidratar lavando tres veces con Acetona usando un volumen total de unos 100 ml.

Llevar el crisol a la estufa y secarlo a 130°C durante dos horas. Dejar enfriar en desecador y pesar rápido. Introducir a continuación el crisol en el horno y dejar

calcinar durante tres horas como mínimo a 550°C. Dejar enfriar en desecador y pesar rápidamente.

## ANEXOS

Cálculos:

$$\%Fibrabruta = \frac{100 * P_1 - P_2}{P_0}$$

Siendo:

P0 = Peso inicial de la muestra.

P1 = Peso del crisol conteniendo la muestra desecada.

P2 = Peso del crisol conteniendo la muestra calcinada.

Referencias. Journal Officiel des Communautés Européenes, número L 83/24, 1973.

## CARBOHIDRATOS

Para su determinación basta con sumar el % de todas las determinaciones y restarlo de 100.

Cálculos:

% de carbohidratos. = 100- Suma de los porcentajes de todas las determinaciones

## ANEXOS

### DATOS PARA EL CÁLCULO DEL GRADO DE HIDROLISIS

Tablas de consumo de la base con respecto al tiempo, empleando papaína.

tiempo (min)	NaOH (ml)	pH
0	10	8
10	10	7.95
20	10	7.95
30	9.9	7.94
40	9.9	7.98
50	9.8	7.96
60	9.8	7.96
70	9.8	7.99
80	9.8	7.96
90	9.8	7.96
100	9.8	7.96
110	9.8	7.96

Tabla a). pH8 T=50°C [e/s]= 2%

tiempo (min)	pH	NaOH (ml)
0	9.05	10
10	8.95	9.2
20	9.01	9
30	9.01	9
40	9.02	8.8
50	9.02	8.8
60	9.02	8.8
70	9.02	8.8
80	9.02	8.8
90	9.02	8.8

Tabla b). pH= 9 T=60°C [e/s]=3%

tiempo (min)	NaOH	pH
0	10	9.996
10	9.6	9.93
20	9.6	9.91
30	9.4	9.94
40	9.4	9.95
50	9.4	9.95
60	9.4	9.94
70	9.4	9.94
80	9.4	9.94
90	9.4	9.94
100	9.4	9.94

Tabla c) pH=10 T=70°C [e/s]= 5%



## ANEXOS

Tablas de consumo de la base con respecto al tiempo, empleando Deterzyme® L-660.

tiempo (min)	NaOH (mL)	pH
0	10	10.01
5	9.8	9.94
10	9.6	9.93
20	9.6	9.92
30	9.4	9.94
40	9.2	9.93
50	9	9.96
60	9	9.94
70	9	9.96
80	9	9.93
90	8.8	9.94
100	8.8	9.93

Tabla a). pH= 10 T=70°C  
[e/s]=5%

tiempo	NaOH (mL)	pH
0	10	10.04
2	9.8	9.91
10	9	9.91
20	8.2	9.91
30	7.6	9.96
40	7.4	9.95
50	7	9.94
60	6.8	9.94
70	6.6	9.95
80	6.4	9.94
90	6.4	9.92

Tabla c ). pH= 10 T=50°C  
[e/s]=2%

tiempo (min)	NaOH (mL)	pH
0	10	10
5	9.8	9.91
10	9.2	9.94
15	9	9.94
20	8.6	9.93
25	8.4	9.92
30	8	9.96
35	8	9.94
40	7.8	9.91
45	7.6	9.97
50	7.4	9.96
55	7.2	9.96
60	7.2	9.94
65	7	9.95
70	7	9.94
75	7	9.94
80	6.8	9.93
85	6.8	9.93
90	6.6	9.97
95	6.6	9.94
100	6.6	9.93
105	6.6	9.92
110	6.6	9.92
115	6.4	9.95
120	6.2	9.92
125	6.2	9.92
130	6	9.92
135	6	9.91

Tabla b ). pH= 10 T=40°C  
[e/s]=1%

## ANEXOS

Tiempo (min)	NaOH	pH
0	10	9
10	8.6	8.9
20	6.6	8.9
30	6.2	8.9
40	6	9
50	5.8	8.8
60	5.8	8.8
70	5.8	8.9

Tabla d). pH= 9 T =50°C [e/s]=2%

Tabla 2. Factores de Calibración (1 /  $\alpha$ ) para pH-Stat en varias Temperaturas

pH	Temperatura (pK para grupos amino)				
	25°C	30°C	40°C	50°C	60°C
	(7.7)	(7.6)	(7.3)	(7.1)	(6.9)
6.5	-	-	-	5.00	3.50
7.0	-	5.00	3.00	2.27	1.79
7.5	2.59	2.27	1.63	1.40	1.25
8.0	1.50	1.40	1.20	1.13	1.08
8.5	1.16	1.13	1.06	1.04	1.03
9.0	1.05	1.04	1.02	1.01	1.01
9.5	1.02	1.01	1.01	1.00	1.00
10	1.01	1.00	1.00	1.00	1.00
10.5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
11.0	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

## ANEXOS

Tabla 3. Contenido de los enlaces peptídicos de varias proteínas de los alimentos

Fuente de proteína	$h_{tot}$ en mep/g ( $Nxf_n$ )
Caseína	8.2
Proteína de suero concentrado	8.8
Carne	7.6
Gelatina	11.1
Hemoglobina	8.3
Proteínas de pescado	11.1
Proteínas de soya	8.6
El gluten de trigo	7.8
Aislado de proteínas de maíz	9.2

De Adler-Nissen (1986)

Nutriente	Ensilaje de avena	Ensilaje de avena + acacia	Ensilaje de avena + chilca	Ensilaje de avena + sauco
Materia seca (%)	28,78	30,04	29,61	30,18
Ceniza (%)	12,13	8,63	10,56	12,80
Extracto Etéreo (%)	3,44	2,48	5,81	3,72
Fibra Cruda (%)	38,66	44,16	33,20	27,53
Proteína (%)	11,43	11,96	14,03	18,00
ELN (%)	34,33	32,80	36,40	37,93
FDN (%)	66,96	70,90	47,70	42,43
FDA (%)	43,63	51,10	30,60	28,30
Hemicelulosa (%)	24,33	19,80	17,03	14,13
Energía Mcal ED/kg MS	2,28	2,28	2,53	2,55
Ácido Láctico (%)	0,71	0,35	0,59	1,06
Ácido Butírico (%)	0,0023	0,0033	0,0046	0,0030

Tabla 3. Composición bromatológica de los ensilajes de avena forrajera (*Avena sativa*) + avena acacia (*Acacia decurrens*), avena + chilca (*Braccharis latifolia*) y avena +sauco (*Sambucus nigra*). Todos los valores expresados en %.

# ANEXOS

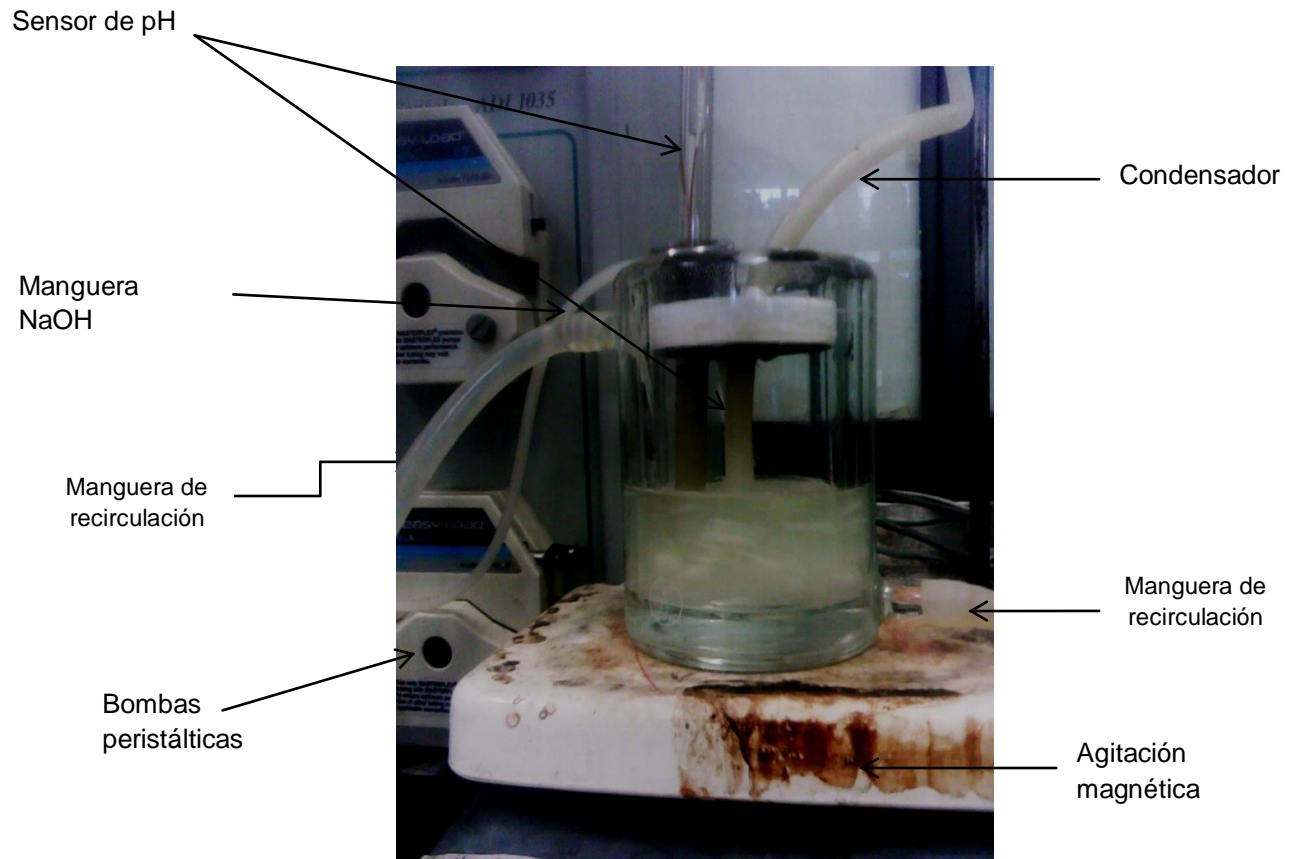


Fig. 6 Hidrólisis

## ANEXOS



Fig. 7 Restos de la hidrólisis con Papaína

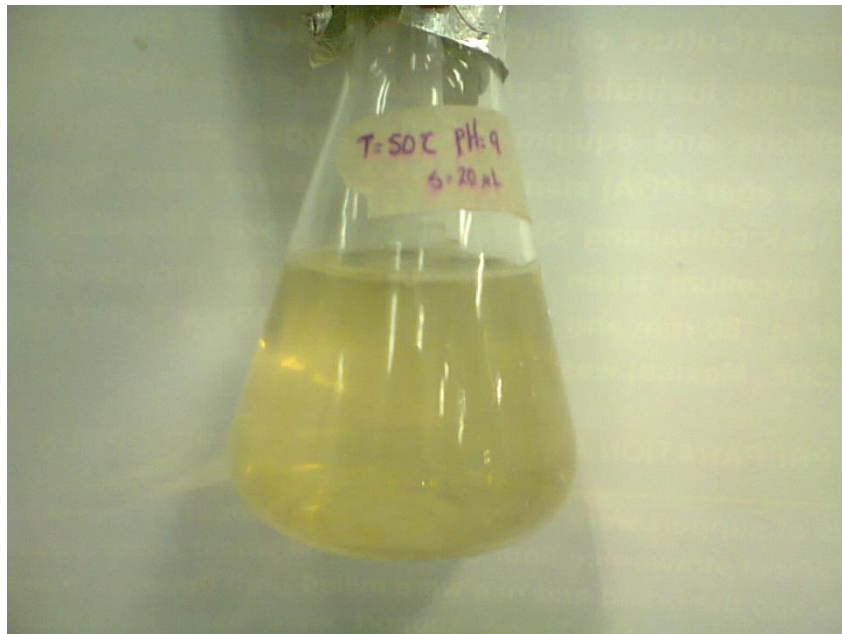


Fig. 8 Restos de la hidrólisis con Deterzyme® L-660

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS Y VIRTUALES

1. Abdel-Aal, ESM.; Hucl, P.; Sosulski, F. W. 1997. Characteristics of canaryseed (*Phalaris canariensis* L.) starch. *Starch* 49: 475-80.
2. A.O.A.C. Official Methods of Analysis of A.O.A.C International 11th ed., Benjamin Franklin Station Washington DC 20044. 1970
3. Adler-Nissen J, Olsen HS. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *ACS SympSer* 1979; 92: 125-46.
4. Adler-Nissen J. *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers; 1986.
5. Benitez, R., Ibarz A., Pagan, J. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2008; 42 (2): 227-36.
6. Caessens PWJR, Daamen WF, Gruppen H, Visser S, Voragen AGJ.  $\beta$ -Lactoglobulin hydrolysis. II. Peptide identification, SH/SS exchange, and functional properties of hydrolysate fractions formed by the action of plasmin. *J AgricFoodChem* 1999; 47: 2980-90.
7. Camacho F., González-Tello P., Jurado E. y Guadix E.M. 1992. Hidrólisis enzimática de Lactoalbúmina. *An. Quim.*, 568- 572.
8. Carter R., y Reck D. R. 1970. Low temperature solvent extraction process for producing high purity zein. U. S. patent 3,535,305.
9. Carrera Jorge. 2003. "Production and application of industrial enzymes". *Revista Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 1:1: 10-15.
10. Coscia, A. A.; Castedo, A. V. 1967. El Alpiste, grano de especulación. Informe técnico N° 70. Estación Experimental Agropecuaria Pergamino – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Argentina.
11. Galvao CMA, Silva AFS, Custodio MF, Monti R, Giordano RDC. Controlled hydrolysis of cheese whey proteins using trypsin and alpha-chymotrypsin. *Appl BiochemBiotechnol* 2001; 91 (3): 761-76.
12. Gil A (ed.): *Tratado de nutrición*. Tomo 1. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Acción Médica. Madrid, 2005.

13. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chem* 2007; 101 (2): 615-20.
14. Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P. y Camacho, F. 2000. "Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas". *Arspharmaceutica*. 41:1: 79-89.
15. Gutiérrez-Álamo, A.; De Ayala, P.P.; Verstegen, M.W.A.; Den Hartog, L.A.; Villamide, M.J. Variability in wheat: Factors affecting its nutritional value. *WorldPoultrySci. J.* 2008, 64, 20–39.
16. Apraez-Guerrero, Insuasty –Santacruz, Portilla-Melo, Hernández-Vallejo. 2012. Composición nutritiva y aceptabilidad del ensilaje de avena (*Avena sativa*), enriquecido con arbustivas acacia (*Acacia decurrens*), chilca (*Braccharis latifolia*) y sauco (*Sambucis nigra*). *Vet.zootec* 6(1): 25-35,2012.
17. Kirk, R.S.; Sawyer, R. Pearson's composition and analysis of foods. Harlow, England, 1999.
18. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chem* 2007; 101 (2): 615-20. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem* 2007; 102 (3): 759-63.
19. Lebenthal E, Lee PC, Heitinger LA. Impact of development of the gastrointestinal tract on infant feeding. *J Pediatr* 1983; 102: 1-9.
20. Lind C.F. y Lee C.R. 1983. Process for the preparation of protein for hydrolysis. *Eur. Pat. Appl. 0,087,245* (to Stauffer Chemical Company, USA).
21. Lin SB, Chiang W, Cordle C, Thomas RL. Functional and immunological properties of casein hydrolysate produced from a two-stage membrane system. *J Food Sci* 1997; 62: 480-3.
22. Mahmoud MI. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol* 1994; 48: 89-5.
23. MaximilianoCogliatti. 2012. Canaryseed Crop. *ScientiaAgropecuaria* 1(2012) 75 88
24. Millward DJ, Jackson AA: Protein/energy ratios of current diets in developed and developing countries compared with a safe protein/energy ratio:

- implications for recommended protein and amino acid intakes. *Public Health Nutrition* 2003;7:387-405.
25. Millward DJ: Macronutrient Intakes as Determinants of Dietary Protein and Amino Acid Adequacy. *J Nutr* 2004; 134:1588S-1596S.
  26. Miravalles, M. T.; Gallez, L. M.; Möckel, F. E. 2002. Alpiste: Revisión de la situación del cultivo. *Agronomy Journal* 22 (1): 7-17.
  27. Robinson, R. G. 1979a. Chemical composition and potential uses of annual canarygrass. *Agronomy Journal* 70: 797-800.
  28. Paraman I, Hettiarachchy NS, Schaefer C, Beck MI. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. *Cereal Chem* 2007; 84 (4): 343-9.
  29. Parodi, L. R. 1987. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería, ACME S.A.C.I. Buenos Aires, Tomo I: 137-138.
  30. Putnam, D. H.; Miller, P. R.; Hucl, P. 1996. Potential for production and utilization of annual canarygrass. *Cereal Food World* 41: 75-83. Quinde, Z.; Ullrich, S.E.; Baik, B.K. Genotypic variation in colour and discolouration potential of barley-based food products. *Cereal Chem.* 2004, 81, 752–758.
  31. Reyes, M., aguilar, C., Prado, L., 2011 “residuos agroindustriales para la producción de proteasas fúngicas” . ciencia cierta revista de divulgación , 7 (27), 20-23.
  32. Ruíz-Henestrosa VP, Carrera-Sanchez C, Yust MM, Pedroche J, Millan F, Rodriguez-Patino JM. Limited enzymatic hydrolysis can improve the interfacial and foaming characteristics of beta-conglycinin. *J Agric Food Chem* 2007; 55 (4): 1536-45.
  33. Sli`y`t`a` R, Dauk`a`sa E, Falch E, Storrø I, Rustad T. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem* 2005; 40 (6): 2021-33.
  34. Tayyab S, Qamar S. A look into Enzyme Kinetics: Some Introductory Experiments. *Biochem Education* 1992; 20 (2): 116-8
  35. Whitaker JR. Principles of enzymology for the food sciences. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker; 1994.



36. Yin S, Tang C, Cao J, Hu E, Wen Q, Yang X. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. Food Chem 2008; 106 (3): 1004-13.

