

# Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones

## *Protein hydrolysates: processes and applications*

► Ricardo Benítez<sup>1\*</sup>, Albert Ibarz<sup>2\*\*</sup>, Jordi Pagan<sup>2\*\*</sup>

- 
1. Magíster en Ciencias Químicas.
  2. Doctor en Ciencias Químicas

\* Grupo de Química de Productos Naturales,  
Departamento de Química, Universidad del  
Cauca, Popayán – Colombia.

\*\* Departamento de Tecnología de alimentos  
UTPV-CeRTA, Universidad de Lleida, Av.  
Rovira Roure, 191, 25198 Lleida – España

### Resumen

En la hidrólisis enzimática de proteínas hasta péptidos o aminoácidos, por acción de enzimas proteolíticas, la composición final y, por tanto, el uso de los hidrolizados dependerá principalmente de la fuente proteica, del tipo de proteasa usada, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción. Los hidrolizados se utilizan ampliamente en la tecnología alimentaria por sus propiedades nutricionales o funcionales (solubilidad, poder emulsificante, capacidad espumante). En este trabajo se muestra la tendencia actual en las técnicas empleadas para la obtención de hidrolizados mediante enzimas y los diferentes métodos usados para el control de estos preparados; se indican además sus posibles aplicaciones.

**Palabras clave:** hidrólisis enzimática \* proteínas \* proteasas \* caracterización \* grado de hidrólisis

### Summary

*In the enzymatic hydrolysis of proteins up to peptides or amino acids, by the action of proteolytic enzymes, the final composition and therefore the use of the hydrolysates will depend on the protein source, on the type of protease used, on the hydrolysis conditions and on the hydrolysis grade reached in the reaction. Hydrolysates are used widely in food technology due to their nutritional or functional properties (solubility, emulsifiant power, foaming capacity). This work shows the present trend in the skills used to obtain hydrolysates by means of enzymes as well as the different methods used for the control of these preparations; besides theirs likely applications are also indicated.*

**Keywords:** enzymatic hydrolysis \* proteins \* proteases \* characterization \* degree of hydrolysis

**Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

## Introducción

En los hidrolizados de proteína se potencian diversas características funcionales, tales como viscosidad baja, mayor capacidad de agitación, dispersión y alta solubilidad, que les conceden ventajas para el uso en muchos productos alimenticios, respecto a las proteínas originales (1-5).

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/o de adultos enfermos. Estas dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como en lactantes con síndromes de malabsorción-malnutrición, con cuadros alérgicos en la mayoría de los casos (6).

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

El grado de hidrólisis es la propiedad fundamental de un hidrolizado y va a determinar en gran medida las restantes características del mismo y por tanto su posible uso. Se define como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. El grado de hidrólisis final está determinado por las condiciones utilizadas, siendo éstas, la concentración de sustrato, la relación enzima/sustrato, el tiempo de incubación y las condiciones fisicoquímicas tales como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la enzima, caracterizada por su actividad específica y tipo de actividad. Así, la naturaleza de la enzima usada no sólo va a influir en el grado de hidrólisis, sino también en el tipo de péptidos producidos.

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.

### HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

La hidrólisis proteica se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. El sustrato se disuelve o resuspende en agua hasta que el pH y la temperatura se estabi-

lizan; a continuación se agrega la proteasa dando inicio a la hidrólisis. A medida que ésta progresa se produce una disminución del pH debido a la rotura de los enlaces peptídicos. En los casos de hidrólisis enzimática el pH debe ser mantenido en el óptimo de la enzima mediante la adición de base diluida. Para finalizar la hidrólisis proteica la enzima puede ser inactivada con calor, mediante una disminución del pH o con una combinación de ambos. O también puede ser retirada del medio mediante filtración y la proteína finalmente precipitada.

### 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. De los sustratos de origen animal se emplea el pescado, principalmente en países orientales, como Japón o Corea. También se han aprovechado las proteínas de residuos cárnicos como tendones o huesos y de microorganismos, como algas.

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 (7). También se ha extendido el uso para este fin de proteínas de huevo, de carne, de sangre, de vísceras e incluso de cereales. Como fuente de fermentación para el crecimiento de microorganismos, se emplean los hidrolizados de levaduras o caseína: éstas también son las fuentes cuando los hidrolizados se usan en cosmética. 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 lactosuero, la materia prima ideal para la preparación de alimentos infantiles y dietas enterales (2) (8-12).

Ya en la reacción propiamente dicha, la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de la proteína afectan su sensibilidad hacia el ataque proteolítico y el tipo de péptidos formados durante la hidrólisis. Las caseínas son proteínas algo más flexibles y son además, fácilmente hidrolizadas. Las proteínas del suero por el contrario, son proteínas globulares, difíciles de acceder para las enzimas proteolíticas. Esta digestibilidad puede ser mejorada por una desnaturalización por calentamiento previo. Otra diferencia importante entre proteínas es su estructura primaria. En proteínas de suero los aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos

están aleatoriamente distribuidos sobre la proteína, mientras las caseínas contienen dominios hidrofílicos e hidrofóbicos distintos. La hidrólisis de las proteínas con diferente distribución de aminoácidos hidrofóbicos y grupos cargados producirá péptidos que difieren en la distribución de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos. En un estudio de hidrolizados de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\beta$ -caseína se demostró que los péptidos obtenidos de hidrólisis de la  $\beta$ -lactoglobulina mostraron distribuciones similares de cargas y grupos hidrofóbicos, careciendo de áreas distintas de hidrofóbicos o hidrofílicos.

Por el contrario, la caseína produjo péptidos que difieren en la distribución de la carga y de los aminoácidos hidrofóbicos en su secuencia (13-15).

#### PROTEASAS COMERCIALES

Actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas grado-alimenticio (Tabla I). Estas proteasas pueden ser clasificadas, por su origen, (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo-actividad) o con base

Tabla I. Algunas de las proteasas disponibles comercialmente en grado alimenticio (15)(18).

Tipo de proteasa	Nombre	Fuente	Temp. (°C)	Intervalo de pH	Sitio de acción catalítica
<i>Serinproteasa</i>					
Animal	Tripsina		30-60	7-9	-*Lis (o Arg) ---
	Quimotripsina	Porcino, bovino	45-55	8-9	-*Trp (o Tir, Fe, Leu) ---
	Elastasa			6-8	-*Ala----
Bacteriana	Substilisín. Carlsberg, Alcalasa	<i>Bacillus licheniformis</i>	50-60	6-10	
	Subst. BPN, Substilisín Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-10	-*AAhf----
<i>Cisteinproteasas</i>					
Plantas	Papaína	Papaya	40-75	5-8	-*Fe (o Val, Leu)-
	Bromelaina	Piña	20-65	5-8	AAhf ---
	Ficina	Látex de Ficus		5-8	
<i>Aspartato proteasas</i>					
Animal	Pepsina	Porcino, bovino		1-4	-Fe (o Tir, Leu)*-Trp
Fúngica	Quimosina	Becerro		4-6	(o Fe, Tir)
	Aspergillopeptidasa A	<i>Aspergillus saitoi</i>	35-50	2-5	Glu, Asp, Leu *---
	Newlasa	<i>Rhizopus sp.</i>	40-50	3-6	Similar a la pepsina
<i>Metaloproteasas</i>					
Animal	Carboxipeptidasa A	Páncreas		7-8	*Carbonilo del AA terminal del péptido, excepto Pro, Arg, Lis
Bacteriana	Neutrasa®	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	40-55	6-7,5	-Fe, Leu, Val*---
	Termolisina	<i>B. thermoproteolyticus</i>		7-9	-Ile, Leu, Val, Fe*---
<i>Preparaciones enzimáticas</i>					
Mezcla de papaína, quimopapaína y lisozima. Mezcla de tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa. Mezcla de serin-, aspartato- y metalo- proteasas. Mezcla de endo- y exo- proteasas, actividad en pH alcalino y neutro.	Papaína cruda	Fruto de la papaya		5-9	Amplia especificidad
	Pancreatina	Páncreas (bovino y porcino)	30-80	7-9	Muy amplia especificidad
	Veron P, Sumicina LP, Biocina A	<i>Aspergillus oryzae</i>	40-55	4-8	Muy amplia especificidad
	Pronasa	<i>Streptomyces griseus</i>		7-9	Muy amplia especificidad

\* Indica sitio de acción de la proteasa sobre el sustrato.

AA<sub>hf</sub> Indica AAs hidrofóbicos.

en su sitio catalítico. 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 de acuerdo con los aminoácidos y otros ligandos que intervienen en la formación del complejo enzima-sustrato. El centro activo contiene aminoácidos o bien cationes metálicos que promueven la catálisis, denominándose serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, según intervengan los aminoácidos serina, cisteína o ácido aspártico. En las metalo-proteasas la actividad está promovida por un catión metálico, siendo el más frecuente el zinc (16). Todas las serinproteasas tienen actividad endo. Contrariamente, las metalo-proteasas son sobre todo exo-proteasas (17).

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. En la Tabla I se presentan algunas de las proteasas comerciales de grado alimentario disponibles en el mercado y se indica la especificidad de parte de ellas. Los preparados enzimáticos suelen ser mezclas de estas enzimas y normalmente se venden en estado líquido o como polvos.

#### ETAPAS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

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

Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), y después la rotura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos. Estos tres pasos se representan esquemáticamente en la Figura 1.

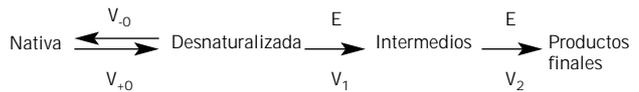


E: enzima, S: sustrato, P, P': péptidos resultantes,  $k_x$ : constante velocidad de reacción.

Figura 1. Mecanismo catalítico de una proteasa (16).

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 2.



v: velocidades de reacción, E: enzima

Figura 2. Teoría de Linderström-Lang (17)

Si la velocidad de desnaturalización ( $v_0 = v_{+0} - v_{-0}$ ) es menor que  $v_1$ , la etapa de desnaturalización es la etapa limitante de la velocidad de hidrólisis y cada proteína desnaturalizada será rápidamente hidrolizada hasta los productos finales. El hidrolizado resultante, además de contener ambas proteínas intactas, contendrá los productos finales, aunque serán deficientes en péptidos de tamaños intermedios. Este tipo de reacción está designada como una reacción "en etapas sucesivas". Si, además, la desnaturalización de la proteína es más rápida que la hidrólisis ( $v_1 < v_0$ ), las moléculas de la proteína serán degradadas a intermedios pero posteriormente son degradadas lentamente en productos finales. Este tipo de reacción es llamada de "cremallera", obteniéndose un hidrolizado que contiene principalmente péptidos de tamaño intermedio. Ambos mecanismos de hidrólisis están implicados en la mayoría de las reacciones proteolíticas (18).

Si la proteína se desnaturaliza irreversiblemente antes de la hidrólisis, el número de enlaces de péptidos disponibles se incrementa notablemente y la degradación de la proteína debería proceder de acuerdo con un tipo de reacción "cremallera". Para estas proteínas desnaturalizadas otros factores tales como la disminución de la solubilidad media influyen en la velocidad de reacción inicial (18).

#### 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,

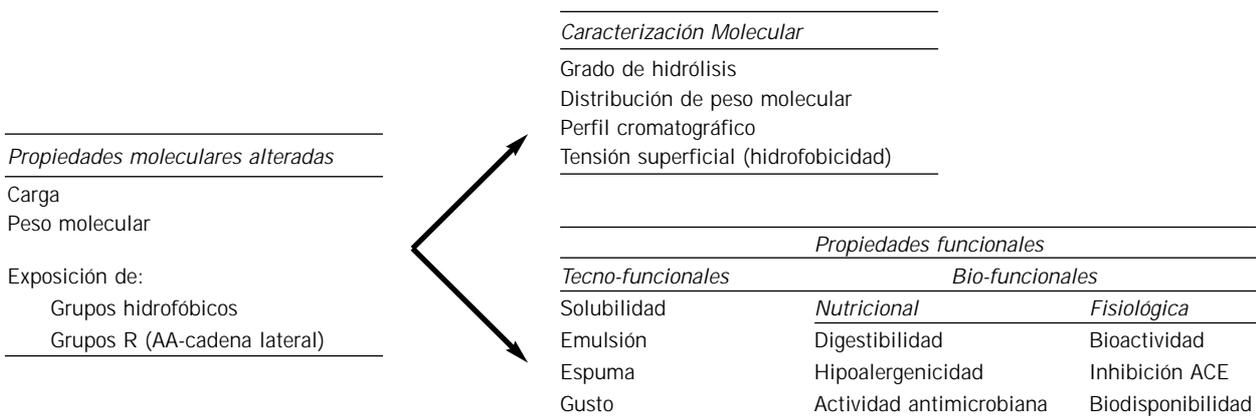
pH, relación enzima-sustrato y el tiempo de reacción. Los primeros 3 factores determinan la velocidad de reacción y pueden influir en la especificidad de la enzima. El tiempo de reacción solamente determina el grado final de hidrólisis (18). Los efectos interactivos entre los parámetros de la hidrólisis 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-stat* en el cual el pH se fija en el valor deseado. En este laboratorio las reacciones con la enzima neutrased<sup>®</sup> de *Novozymes*, se efectúan en un biorreactor *Minifors*<sup>®</sup>, de la empresa Infors HT - Bottningen, Suiza, con control y regulación automática del pH, lo que permite que la enzima siempre actúe en el valor óptimo de pH determinado y el cálculo final de base o ácido consumido durante el proceso, pueda traducirse en el cálculo del grado de hidrólisis, como se verá más adelante.

Hasta el presente, los estudios efectuados sobre cinética de la hidrólisis han sido escasos, aplicándose en general la cinética de tipo Michaelis-Menten (19) (20) que es demasiado simple para representar el mecanismo de la hidrólisis de proteínas, o bien cinéticas empíricas con 3-5 parámetros de ajuste lo que limita su aplicabilidad (21).

## 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 (22). Estos cambios moleculares pueden ser detectados con varios métodos analíticos, los cuales reflejan una o varias propiedades fisicoquímicas de las moléculas (Fig. 3). Como resultado de los cambios moleculares, las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas (Fig. 3). 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 (23). 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 bio-activos. Finalmente, las propiedades tecno-funcionales representan funcionalidad tecnológica, tales como solubilidad, propiedades emulsificantes y espumantes (Fig. 3).

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 (24) o cromatografía de exclusión por tamaño (20) (25) (26). Estas técnicas se usan frecuentemente para comparar la acción hidrolítica de varias proteasas, o para caracterizar hidrolizados hipoalergénicos. Finalmente, los hidrolizados



ACE: Enzima convertidora de angiotensina.

Figura 3. Cambios en las características de la proteína debido a la hidrólisis.

se caracterizan ocasionalmente mediante cromatografía de fase reversa (20) (24), 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 (27).

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 desnaturada 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 750 nm. 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 (28).

#### 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 (18).

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

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 (29), 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 compara con OPA y TNBS, los cuales correlacionan bien (30). El método del TNBS (7), 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 (31). 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 420 nm. 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 (30).

#### 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 ( $N_2$ ), midiéndose el volumen desprendido, con buena correlación contra otros métodos espectrofotométricos (29) (32).

#### 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 (18) (33). 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 (34).

#### 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 peptídica (PCL) de los hidrolizados (ecuación 2), asumiendo que todos los hidrolizados son solubles (18).

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

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 (22). 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 (35-37). 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 (38).

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 (39-41). Sin embargo, para péptidos grandes, la longitud del péptido también influye en el tiempo de retención (41) (42). 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 (43) (44). Lemieux y Amiot (45) (46) 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 (45) (46).

### 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 (22) (47).

### 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 (22) (48). 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) (49). 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 (50) (51).

### 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 (7). 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. (52) (53). Se han propuesto varios métodos analíticos para predecir el sabor amargo de los hidrolizados. Adler-Nissen (34) 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 (54) y a través de la espectroscopía infrarroja (55) 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 (56), divulga la mejora en la emulsión y formación de espuma para los hidrolizados tripticos 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 (1) (4) (57-59).

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 (60).

### AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al Ministerio del Medio Ambiente Español, Expediente 521/2006/3-8.2, por la financiación del proyecto de investigación.

Ricardo Benítez agradece a COLCIENCIAS - Colombia por el financiamiento para su programa doctoral.

### CORRESPONDENCIA

RICARDO BENÍTEZ B.  
rbenitez@unicauca.edu.co  
rbenitez@tecal.udl.cat  
Calle 5 # 4 - 70 POPAYÁN - Colombia  
Tel: 0057 2 8209800 EXT 2334 - 2320  
Fax: 0057 2 8209800 EXT 2306.

JORDI PAGAN i GILABERT  
jpagan@tecal.udl.cat  
Av. Alcalde Rovira Roure, 191  
25198 LLEIDA - España  
Tel : 0034 - 973702817  
Fax : 0034 - 973702596 -973238264

Para solicitud de separatas:  
Jordi Pagan i Gilabert  
jpagan@tecal.udl.cat

### Referencias bibliográficas

1. 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.
2. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chem* 2007; 101 (2): 615-20.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

6. Lebenthal E, Lee PC, Heittinger LA. Impact of development of the gastrointestinal tract on infant feeding. *J Pediatr* 1983; 102: 1-9.
7. Adler-Nissen J, Olsen HS. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. *ACS Symp Ser* 1979; 92: 125-46.
8. Bhaskar N, Benila T, Radha C, Lalitha RG. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Biores Technol* 2008; 99(2): 335-43.
9. Vairo-Cavalli S, Silva SV, Cimino C, Malcata FX, Priolo N. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers. *Food Chem* 2008; 106 (3): 997-1003.
10. Wang J, Zhao M, Yang X, Jiang Y. Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *J Cereal Sci* 2006; 44(1): 93-100.
11. Celus I, Brijs K, Delcour JA. Enzymatic hydrolysis of Brewers' spent grain proteins and techno functional properties of the resulting hydrolysates. *J Agric Food Chem* 2007; 55 (21): 8703-10.
12. Kamnerdpetch C, Weiss M, Kasper C, Scheper T. An improvement of potato pulp protein hydrolyzation process by the combination of protease enzyme systems. *Enzyme Microb Technol* 2007; 40(4): 508-14.
13. Caessens PWJR. Enzymatic hydrolysis of  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin. Foam and emulsion properties of peptides in relation to their molecular structure. Ph D Thesis, Wageningen Agricultural University, The Netherlands 1999.
14. Guo MR, Fox PF, Flynn A, Kindstedt PS. Susceptibility of beta-lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *J Dairy Sci* 1995; 78: 2336-44.
15. Qi W, He Z. Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Front Chem China* 2006; 1 (3): 308-14.
16. Adler-Nissen J. Proteases. In: Nagodawithana T, Reed G, Eds. *Enzymes in food processing*. San Diego (USA): Academic Press; 1993. p. 159-203.
17. Whitaker JR. *Principles of enzymology for the food sciences*. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker; 1994.
18. Adler-Nissen J. *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers; 1986.
19. Madsen JS, Ahmt TO, Halkier T, Qvist KB. Hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin by four different proteinases monitored by capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography. *Int Dairy J* 1997; 7: 399-409.
20. Tayyab S, Qamar S. A look into Enzyme Kinetics: Some Introductory Experiments. *Biochem Education* 1992; 20 (2): 116-8.
21. Margot A, Flaschel E, Renken A. Empirical kinetic models for tryptic whey protein hydrolysis. *Process Biochem* 1997; 32 (3): 217-23.
22. 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 Agric Food Chem* 1999; 47: 2980-90.
23. Mahmoud MI. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technol* 1994; 48: 89-5.
24. Galvao CMA, Silva AFS, Custodio MF, Monti R, Giordano RDC. Controlled hydrolysis of cheese whey proteins using trypsin and alpha-chymotrypsin. *Appl Biochem Biotechnol* 2001; 91 (3): 761-76.
25. 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.
26. Sliřtř R, Daukřsa 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.
27. Kim SB, Shin HS, Lim JW. Separation of calcium-binding protein derived from enzymatic hydrolysates of cheese whey protein. *Asian-Australas. J Anim Sci* 2004; 17 (5): 712-8.
28. Novo Industrias. Determination of neutrase using the Anson Hemoglobin Method. *Analytical Method*. EB-SM-0348.01/01, 2001.
29. A.O.A.C. *Official Methods of Analysis of A.O.A.C International* 18th ed., A.O.A.C International, Gaithersburg, MD, USA 2005.
30. Panasiuk R, Amarowicz R, Kostyra H, Sijtsma L. Determination of alpha-amino nitrogen in pea protein hydrolysates: a comparison of three analytical methods. *Food Chem* 1998; 62: 363-7.
31. Camacho F, González-Tello P, Jurado E, Guadix E.M. Hidrólisis enzimática de lactoalbúmina. *An Quim* 1992; 568-72.
32. Hung ND, Vas M, Cheke E, Bolcsi SZA. Relative tryptic digestion rates of food proteins. *J Food Sci* 1984; 49: 1535-42.
33. Camacho F, Gonzalez-Tello P, Paez-Duenas MP, Guadix EM, Guadix A. Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *J Dairy Res* 2001; 68: 251-65.
34. Adler-Nissen J. Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures. In: Feeney RE, Whitaker JR, Eds. *Protein tailoring for food and medical uses*. New York: M Dekker; 1986. p. 97-122.
35. Tossavainen O, Syvaaja EL, Tuominen J, Heinanen M, Kalkkinen N. Determination of the peptide size range of an extensively hydrolysed protein hydrolysate. *Milchwissenschaft* 1997; 52: 63-7.
36. Smyth M, Fitzgerald RJ. Characterisation of a new chromatography matrix for peptide molecular mass determination. *Int Dairy J* 1997; 7: 571-7.
37. Fujinari EM, Manes JD. Determination of molecular-mass distribution of food-grade protein hydrolyzates by size-exclusion chromatography and chemiluminescent nitrogen detection. *J Chromatogr A* 1997; 763: 323-9.

38. Zu R, He Z, Qi W. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Changes in the aggregate size and molecular weight distribution. *Food Chem* 2008; 107 (1): 151-7.
39. Qi W, He Z, Shi D. Product distribution of casein tryptic hydrolysis based on HPSEC analysis and molecular mechanism. *Chem Eng Sci* 2003; 58 (3-6): 767-75.
40. Soares RDL, Silva VD, Lopes DC, Junqueira RG, Figueiredo AFS, Silvestre MPC. Peptide profile of enzymatic hydrolysates from skim milk powder. *Rev Bras Cienc Farm* 2004; 40 (3): 353-62
41. Hearn MTW, Aguilar MI, Mant C, Hodges RS. High performance liquid chromatography of amino acids, peptides and proteins. LXXXV: Evaluation of the use of hydrophobicity coefficients for prediction of peptide elution profiles. *J Chromatogr* 1988; 438: 197-210.
42. Chabanet C, Yvon M. Prediction of peptide retention time in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1992; 599: 211-25.
43. Uhlig H. *Industrial enzymes and their applications*. New York: Wiley and S; 1998.
44. Sližtā R, Daukāsa E, Falch E, Storrø I, Rustad T. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochem* 2005; 40 (3-4): 1415-24.
45. Lemieux L, Amiot J. Application of reversed-phase high-performance liquid chromatography to separation of peptides from phosphorylated and dephosphorylated casein hydrolysates. *J Chromatogr* 1989; 73: 189-206.
46. Lemieux L, Amiot J. Efficiency of five chromatographic systems for the separation of casein digest. *J Liq Chromatogr* 1990; 13: 4023-35.
47. Jayaprakasha HM, Yoon YC. Characterization of physicochemical and functional behavior of enzymatically modified spray dried whey protein concentrate. *Milchwissenschaft* 2005; 60 (3): 305-9.
48. Slattery H, Fitzgerald RJ. Functional properties and bitterness of sodium caseinate hydrolysates prepared with a *Bacillus* proteinase. *J Food Sci* 1998; 63: 418-22.
49. Svenning C, Molland T, Langsrud T, Vegarud GE. A characterization study of peptides derived from casein proteolysis. In: IDF, Ed. *Protein and fat globule modifications by heat treatment, homogenisation and other technological means for high quality dairy products: Proceedings of the IDF seminar held in Munich*. Sonthofen (Germany): International Dairy Federation; 1993. p. 96-105.
50. Wasswa J, Tang J, Gu X, Yuan X. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chem* 2007; 104 (4): 1698-704.
51. Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Nam MS, Kim HS. Separation of iron-binding protein from whey through enzymatic hydrolysis. *Int Dairy J* 2007; 17 (6): 625-31.
52. Li L, Yang ZY, Yang XQ, Zhang GH, Tang SZ, Chen F. Debittering effect of *Actinomucor elegans* peptidases on soybean protein hydrolysates. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008; 35 (1): 41-7.
53. Humiski LM, Aluko RE. Physicochemical and bitterness properties of enzymatic pea protein hydrolysates. *J Food Sci* 2007; 72 (8): S605-11.
54. Frister H, Michaelis M, Schwerdtfeger T, Folkenberg D.M, Sorensen NK. Evaluation of bitterness in Cheddar cheese. *Milchwissenschaft* 2000; 55: 691-5.
55. Sorensen LK, Jepsen R. Assessment of sensory properties of cheese by near-infrared spectroscopy. *Int Dairy J* 1998; 8: 863-71.
56. Chobert J.M, Bertrand-Harb C, Nicolas M.G. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J Agric Food Chem* 1988; 36: 883-92.
57. Govindaraju K, Srinivas H. Controlled enzymatic hydrolysis of glycinin: Susceptibility of acidic and basic subunits to proteolytic enzymes. *LWT-Food Sci. Technol* 2007; 40 (6): 1056-65.
58. Severin S, Xia WS. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *J Food Biochem* 2006; 30 (1): 77-97.
59. Martinez KD, Baeza RI, Millán NF, Pilosof AMR. Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams. *Food Hydrocolloids* 2005; 19 (3): 361-9.
60. Wang JS, Zhao MM, Yang XQ, Jiang YM. Improvement of emulsifying properties of wheat gluten hydrolysate/l-carrageenan conjugates. *Food Technol Biotechnol* 2006; 44 (1): 25-32.

**Aceptado para su publicación el 4 de marzo de 2008**

