



**ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS CINÉTICOS ASOCIADOS A LA HIDRÓLISIS
ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DE SANGRE BOVINO Y SU RELACIÓN CON LA
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS HIDROLIZADOS OBTENIDOS**

Omar Alfredo Figueroa Moreno

Tesis doctoral presentada para optar al título de Doctor en Ingeniería Ambiental

Director

José Edgar Zapata Montoya, Doctor (PhD) en Biotecnología

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería Ambiental
Medellín, Antioquia, Colombia
2023

Cita

(Figuroa Moreno O.A; 2013)

Referencia

Estilo APA 7 (2020)

Figuroa Moreno O.A. (2023). *Análisis de los mecanismos cinéticos asociados a la hidrólisis enzimática de proteínas de sangre bovino y su relación con la actividad biológica de los hidrolizados obtenidos* [Tesis doctoral]. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.



Doctorado en Ingeniería Ambiental, Cohorte VIII.

Grupo de Investigación Nutrición y Tecnología de Alimentos.

Centro de Investigación Ambientales y de Ingeniería (CIA).



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

Este trabajo se lo dedico especialmente a mi madre. Ella me enseñó como sortear la adversidad y seguir de pie para un nuevo reto. A mi hermosa familia, mi esposa Karen y mi hija Belén, quienes de forma incondicional me acompañaron cada minuto de este proceso. Una gratitud infinita por apoyarme en los duros momentos y sonreír conmigo en los buenos días, todos estos años.

Agradecimientos

Agradezco mucho a mi familia (mi hija, mi esposa, mi mamá y mis hermanos: Hugo y Yesenia) y a mi tutor, el profesor José Edgar Zapata Montoya. A La Universidad de la guajira, El Ministerio de Ciencia Tecnología e Innovación (Beca Doctoral 727). A Mi Codirector, el profesor Gail Albeiro Gutiérrez. Al grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos.

De manera muy especial agradezco el apoyo incondicional y efectivo de Jader Alean Valle (mi otro asesor). Así como el del profesor Manuel Réndeles y el de Ismael Marcet de la Universidad de Oviedo (España).

De igual forma doy las gracias a Sulmira Medina, Víctor Pinedo y Kellys Rodríguez en la Universidad de la guajira.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y MARCO CONCEPTUAL	10
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL	10
1.2. MARCO TEÓRICO	12
1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	52
CAPÍTULO 2. OPTIMIZACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN GLOBULAR DE SANGRE BOVINA Y EFECTO DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.....	68
2.1. INTRODUCCIÓN	69
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	69
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
2.4. CONCLUSIONES	78
CAPÍTULO 3. EL ROL DE LA RELACIÓN ENZIMA-SUSTRATO EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS DE PLASMA BOVINO	81
3.1. INTRODUCCIÓN	82
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	83
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
3.4. CONCLUSIONES	98
CAPÍTULO 4. INFLUENCIA DEL SUSTRATO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FRACCIONES PEPTÍDICAS CON POTENCIAL BIOACTIVO: PLASMA BOVINO-ALCALASA 2.4L	102
4.1. INTRODUCCIÓN	103
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	105
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	108
4.4. CONCLUSIONES	121
CAPÍTULO 5. FENÓMENOS DE INHIBICIÓN POR PRODUCTO: DEFINICIÓN DE UN MODELO CINÉTICO-CONCEPTUAL DE LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE PLASMA BOVINO- ALCALASA 2.9L	125

5.1. INTRODUCCIÓN	126
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	127
5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	129
5.4. CONCLUSIONES	138
CAPÍTULO 6. LOS MODELOS DE POBLACIÓN APLICADOS AL ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES EN LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS.....	
6.1. INTRODUCCIÓN	142
6.2. DESCRIPCIÓN DEL MODELO.....	144
6.3. SOLUCIÓN DEL MBP POR EL MÉTODO DE LOS MOMENTOS	147
6.4. VALIDACIÓN DEL MODELO	149
6.5. CONCLUSIONES	152
CAPÍTULO 7. ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DE INTERÉS ANTIOXIDANTE EN PLASMA BOVINO Y DERIVADOS.....	
7.1. INTRODUCCIÓN	156
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	157
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	163
7.4. CONCLUSIONES	175
CONCLUSIONES GENERALES	180
PERSPECTIVAS FUTURAS	184

LISTA DE FIGURAS

Fig. 2.1. Superficie de respuesta para GH con S_0 constante 10 % (m/V).....	77
Figura. 3.1. Esquema del sistema de reacción de hidrólisis utilizado en el experimento.	84
Fig. 3.2 Representación gráfica de inversos de velocidad inicial ($1/v_0$) a distintas concentraciones de sustratos ($1/S_0$ de 1-20 g/L) según Lineweaver-Burk.....	88
Fig. 3.3. Actividad antioxidante medida por (A) ABTS y (B) FRAP en plasma bovino para diferentes concentraciones de enzima (E_0) Vs. GH, con S_0 constante de 10 g/L.....	92
Fig. 3.5. Porcentaje de quelación de Fe^{+} Vs. % GH de HPB a Concentración de sustrato 10 g/L, empleando 300 mg/L de enzima	94
Fig. 3.6. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC): A) Fracciones ultrafiltradas (>10, <10, 3-10, <3, <1 kDa), hidrolizado de plasma bovino (HPB) y plasma entero bovino (PEB) y B) Fracciones separadas por HPLC-RP (F1, F2 y F3). C) Perfil cromatográfico para hidrolizados desalados <1kDa obtenidos con niveles de enzima inicial media (300 mg/L) y alta (600 mg/L).....	97
Fig. 4. 1. Curva de hidrólisis (DH Vs time) hidrolizados de plasma entero sin diálisis (A) y plasma bovino dializado (B). Usando Alcalasa 2.9 L con diferentes concentraciones de proteínas ($S_0=5,10,15,20$ g/L) y una relación enzima-sustrato de 1:25	109
Fig. 4.2. Curva de hidrólisis (DH Vs tiempo) de fracciones proteicas mayoritarias del plasma bovino: BSA (A) y γ -Globulinas (B). Empleando Alcalasa 2.9 L con diferentes concentraciones de sustrato inicial ($S_0=5,10,15,20$ g/L).....	111
Fig. 4.3. Distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino dializado con Alcalasa 2.9 L. Hidrolizados obtenidos con $S_0=5$ g/L (A) y 20 g/L (B).....	112
Fig. 4.4. Abundancia relativa de péptidos encontrados en el permeado de los hidrolizados ultrafiltrados (MWCO 3,0 kDa) considerando su tamaño. F5 es el permeado obtenido cuando la concentración inicial de proteína en el reactor fue 5 g/L; F10: 10 g/L; F15: 15 g/L y F20: 20 g/L.	114
Fig. 4. 5. Composición de aminoácidos de los péptidos encontrados en los permeados (MWCO 3,0 kDa) obtenidos a partir de los hidrolizados de plasma bovino-Alcalasa (DH= 19%) con $S_0=5,10,15$ y 20 g/L (F5, F10, F15 and F20 respectivamente).	115
Fig. 4.6. Número de péptidos encontrados en las fracciones: F5, F10, F15 and F20 ($S_0=5,10,15$ and 20 g/L, respectivamente) con un SVM score mayor o igual a 0,9 y con SVM score más bajos que 0.9 de acuerdo con los resultados obtenidos con la plataforma AHTpin (https://webs.iiitd.edu.in/raghava/ahtpin/help.php).....	119
Fig. 4.7. Vista de primer plano de los contactos enzima-ligando en complejos entre la ACE y péptidos seleccionados (A: YNPDOOKVK, B: GEVLPLPEANFPSF, C: VSFTLPRSPTSQE, D:	

VSLPEVPGEY). Los átomos del ligando se muestran en forma de ball-and-stick (C en naranja, O en rojo y N en azul). El número de contactos de ACE-péptido se indica para cada complejo (Zn: Zn-O interacciones, HB: enlaces de hidrógeno y VdW: interacciones de Van der Waals). El número de contactos con los residuos de ACE en el S1 (Ala354, Glu384, and Tyr523), S1' (Glu162), y S2' (Gln281, His353, Lys511, His513, and Tyr520) también se incluyen sitios de unión (residue numbering as in the 1O86 PDB structure). 120

Fig. 5.2. A) Grafica de Lineweaver–Burk para los datos experimentales de hidrolizado de plasma bovino con Alcalasa a $T=60^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=9.0$, sin inhibidor, con inhibidor ($I_1= 3.735$ e $I_2= 7.47$ mM); B) Grafica secundaria que representa la pendiente (m) de la curva Lineweaver–Burk para la estimación K_i 131

Fig. 5.3. Desactivación enzimática de Alcasa 2.4 L con ajuste a cinética de primer orden en condiciones reaccionantes y en presencia de sustrato de hidrólisis a 1g/L. 132

Fig. 5.4. Representación graficas de la validación del modelo propuesto para el caso en el que el parámetro de inhibición K_i es constante. Predicción del módelo propuesto (línea continua). Datos experimentales (marcadores). 134

Fig. 5.5. Distribución de pesos moleculares Vs tiempo para distintos niveles de sustrato inicial S_0 . A) 5 g/L de sustrato y B) 20 g/L de sustrato 135

Fig. 5.6. Representación graficas de la validación del modelo propuesto para el caso en el que el parámetro de inhibición K_i es una función de la ruptura de enlaces. Predicción del módelo propuesto (línea continua). Datos experimentales (marcadores). Para las diferentes condiciones iniciales de sustrato: $S_0=5,10,15$ y 20 g/L..... 136

Fig. 9. Grafica de error para de los valores predichos por el modelo y los datos experimentales en las diferentes condiciones iniciales de sustrato: $S_0=5,10,15$ y 20 g/L. 137

Fig. 6.1. Estrategia de análisis propuesta por Shi et al., (2005) en la determinación experimental de pesos moleculares (kDa) de la hidrolizados enzimáticos de BSA-tripsina, por cromatografía por exclusión por tamaños (HP-SEC), aplicando una estrategia de agrupamiento con fracciones en tamaños moleculares en rangos definidos. 149

Fig. 6.2. Concentración predicha (línea continua) Vs concentración experimental (puntos) para los hidrolizados enzimáticos de BSA-tripsina determinados por HP-SEC, en distribución de pesos moleculares (v) expresada en kDa, para temperaturas de 35°C (A) y 45° (B). 150

Fig. 6.4. Distribución de pesos moleculares predichos por MBP (líneas continuas en colores) Vs datos experimentales para diferentes tiempos ($t=15,25,40$ y 150 min) de hidrolizados enzimáticos de BSA-Alcalasa determinados por HPLC-SE. 151

Fig. 7.1. Superficie de respuesta para la optimización de actividad antioxidante ABTS medida en $\mu\text{mol ET/proteína}$ de hidrolizados de plasma bovino-Alcalasa 2.4 L; A) Comportamiento de la $T^{\circ}\text{C}$ y el pH para un nivel de $E/S= 7,5\%$ (p/p) y B) Comportamiento de la pH y la E/S para un nivel de $T= 62.5^{\circ}\text{C}$ 165

Fig. 7.2. Superficie de respuesta para la optimización GH_{max} de hidrolizados de plasma bovino-Alcalasa 2.4 L; A) Comportamiento de la T °C y el pH para un nivel de E/S= 7,5% (p/p) y B) Comportamiento de la pH y la E/S para un nivel de $T= 62.5$ °C.166

Fig. 7.3. Curva de GH Vs tiempo (min) para hidrolizados de BSA bovina con Alcalasa 2.9 L..169

Fig. 7.6. Porcentaje de cada aminoácido del total de los 16 péptidos identificados con potencial antioxidante estimados por el meta predictor: mAHTPred.174

RESUMEN GENERAL

En este trabajo se desarrolló una estrategia que comprende dos enfoques principales para el análisis de la relación entre aspectos cinéticos de la reacción y la bioactividad de hidrolizados enzimáticos de sangre bovino. Por un lado, la utilización de técnicas analíticas *in vitro* en el análisis del potencial antioxidante (FRAP, ABTS, ORAC, quelante de Fe) e inhibidor de la ACE expresado por los hidrolizados de sangre bovino con Alcalasa en función de las condiciones de operación (pH, T, S0 y E/S, con tratamiento y con ultrasonido previo a la hidrólisis). Las fracciones hidrolizadas se filtraron (ultrafiltración) por diferentes tamaños moleculares. Técnica de separación cromatográfica SE-HPLC y RP-HPLC se utilizaron para la caracterización de hidrolizados. El efecto de la concentración de sustrato inicial tras la definición de (E/S) constantes se evaluó para comprender aspectos asociados a la preferencia de producción peptídica, en condiciones de operación variada (S0 variable), tras identificación de las secuencias con potencial bioactivo, utilizando UHPLC-Q-TOF-MS.

El rol de la (E/S) sobre la productividad y la bioactividad en el tiempo de reacción se probó con un diseño de medidas repetidas y la influencia la (E/S) sobre la actividad antioxidantes se estableció tras la caracterización y análisis de las fracciones por ultrafiltración y RP-UHPLC. La segunda estrategia desarrollada en este trabajo fue el modelamiento matemático de las reacciones de hidrólisis enzimática. Se estudió el comportamiento cinético a través de las curvas de hidrólisis, con el uso y verificación de modelos empíricos y modelos de fundamento cinético y conceptual, para la comprensión de aspectos operativos en la mejora de las condiciones de operación tendientes a maximizar los rendimientos de la reacción y disminuir los costos relacionados con la enzima. De igual forma se emplearon los modelos de balance de población, adaptados como novedad a un proceso de hidrólisis al azar de enlaces peptídicos en una secuencia proteica para predecir la distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de BSA bovina, obtenidos con distintas condiciones de temperatura y sustrato inicial.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN, OBJETIVOS Y MARCO CONCEPTUAL

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los hidrolizados de proteínas poseen diversas características funcionales, tales como: baja viscosidad, capacidad de agitación, dispersión y alta solubilidad. Estas propiedades, les conceden ventajas para el uso en muchos productos alimenticios respecto a las proteínas originales (Je et al., 2007; Yin et al., 2008), lo que los hace ser considerados para su utilización en muchos procesos alimentarios. Esta funcionalidad depende en gran medida del peso molecular, la estructura y secuencia de la cadena de aminoácidos del péptido resultante (Chalamaiah et al., 2012). Las proteínas y péptidos procedentes de alimentos están siendo empleados con el fin de mejorar algunas funciones biológicas o de tratar de prevenir o reducir el riesgo de enfermedad, pues se ha establecido que algunos péptidos obtenidos por hidrólisis son capaces de ejercer efectos biológicos específicos, tales como antimicrobianos, antivirales, anticancerígenos, opioides, antioxidantes, antihipertensivos, antitrombóticos y citomoduladores (Du & Li, 2022).

Los péptidos bioactivos son péptidos cortos de aproximadamente 2-30 amino ácidos de longitud. Ellos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína matriz y pueden ser liberados durante la digestión gastrointestinal en la digestión de alimentos o por hidrólisis con enzimas comerciales (Di Bernardini et al., 2011a). Estos péptidos con actividad biológica, han sido aislados a partir de proteínas de varias fuentes, como leche, maíz, soja, huevo, gelatina, arroz, pescado, garbanzo, etc. (Du & Li, 2022; Felix et al., 2020; Gao et al., 2021; Rani et al., 2018;). En hidrolizados de proteínas de plasma y hemoglobina bovina, por ejemplo, se confirmó actividad inhibidora de la enzima convertidora de la Angiotensina (ACE) (Hyun & Shin, 2000b) y antioxidante (Liu et al., 2010; Seo et al., 2015).

Diferentes estudios han confirmado la relación existente entre la actividad biológica de los péptidos y su peso molecular (Bourseau et al., 2009; Fernández et al., 2013; Saidi et al., 2014a). En particular las fracciones de péptidos con pesos moleculares entre 1- 4kDa, serían las más interesantes para usos nutricionales y/o farmacéuticos (Saidi et al., 2014b).

Actualmente, existen varias tecnologías para el aislamiento y purificación a escala piloto de péptidos bioactivos, atendiendo al tamaño molecular. Se destacan las técnicas cromatográficas y las estrategias de separación que utilizan membranas de ultra y nanofiltración (Li-Chan, 2015; Saidi et al., 2013). Tanto la ultra como la nanofiltración son tecnologías utilizadas con relativo éxito para purificar péptidos con efectos bioactivos de hidrolizados de proteínas lácteas, soya y sustratos vegetales (de Castro & Sato, 2015; Picot et al., 2010), lo que sugiere que son alternativas funcionales para el aprovechamiento de subproductos a través de la hidrólisis enzimática de mezclas de proteínas.

Considerando estas aplicaciones, se ha despertado el interés por predecir el comportamiento de sistemas que contemplan reacciones de hidrólisis enzimática a través de ordenadores, con el fin de dimensionar equipos industriales, pronosticar comportamientos dinámicos, controlar tiempos de proceso y otras variables cinéticas (P. Valencia et al., 2014). El modelamiento de reacciones de hidrólisis de proteínas se ha abordado desde diferentes perspectivas y existe en la literatura un considerable número de trabajos que muestran el avance y las dificultades asociadas a modelar

estas reacciones, pues es bien sabido que, el comportamiento cinético puede llegar a ser muy complejo para sistemas con sustratos como las proteínas, debido al gran número de enlaces y peptídicos disponibles (Deng, Butré, et al., 2018; Deng, van der Veer, et al., 2018; P. L. Valencia et al., 2016).

En el interior del grupo de investigación se ha avanzado en el estudio del aprovechamiento de sangre bovina, considerando que, en Colombia se registra el sacrificio de alrededor de 4 millones de cabezas de ganado vacuno al año, que genera aproximadamente 48.000 toneladas de sangre de bovino, de las que se puede obtener aproximadamente 8.600 toneladas de proteínas de alto valor biológico y nutricional (FEDEGAN, 2021). Se ha demostrado que las fracciones peptídicas obtenidas de plasma entero bovino poseen importantes propiedades antioxidantes y antihipertensivas (Gómez et al., 2013). Así mismo, se han realizado aproximaciones relacionadas con los mecanismos cinéticos implicados en la hidrólisis de este sustrato (Figuroa et al., 2012). En la literatura científica, se tiene la propuesta de Valencia et al., 2014, la que desarrolla una estrategia con la cual es posible caracterizar los efectos de la concentración de sustrato y producto, inactivación térmica de la enzima y la posible modulación por sustratos y producto, a través de la combinación de un enfoque experimental con bases teóricas. Estos resultados conducen a la evaluación de estrategias de operación para optimizar el comportamiento de reactores en reacciones enzimáticas, teniendo en cuenta los efectos variables de la temperatura en el rendimiento de las reacciones (Valencia et al., 2016).

Por otro lado, es justo mencionar los aportes de (Margot et al., 1997; Márquez and Vázquez, (1999); Qi and He, (2006); Shi et al., (2005); Trusek-Holownia and Noworyta, (2015^a); Valencia et al., (2015) y los recientes avances de Fernández and Riera, (2013) y Trusek-Holownia and Noworyta, (2015). Los primeros proponen un modelo cinético para explicar la dinámica de formación y degradación de β -Lactoglobulina y péptidos derivados obtenidos mediante la digestión con tripsina, mientras que los segundos proponen un modelo con un menor número de constantes para la determinación cualitativa (la longitud de la cadena y la secuencia de unidades manométricas en ellos) y cuantitativa del hidrolizado de las reacciones cinéticas, sugiriendo que es un modelo general para todas las sustancias poliméricas.

Al inicio de esta investigación existían pocas referencias de trabajos científicos que además de contemplar la cinética en términos cualitativos y cuantitativos de la hidrólisis enzimática de proteínas, relacionen la actividad biológica (antioxidante y antihipertensiva) con los productos obtenidos. Por lo cual, es clara la necesidad de avanzar en el desarrollo de estrategias científicas que conduzcan a la generación de productos de peso molecular controlado con funciones específicas (Saidi et al., 2014). Es posible abordar esto a través de estudios que contemplen el análisis de aspectos asociados con los mecanismos cinéticos implícitos, así como el estudio de la actividad biológica de las fracciones peptídicas, monitoreadas en el tiempo de reacción y su relación con las propiedades moleculares de los péptidos bioactivos obtenidos.

Recientemente ha cobrado interés las técnicas bioinformáticas de análisis en la medida en que proporcionan una manera útil y ágil de estudiar los requerimientos estructurales de los péptidos en función de sus actividades. Estos son los denominados modelos de relación estructura-actividad cuantitativos (QSAR). El uso de esta metodología se muestra hoy como un método efectivo para identificar las relaciones matemáticas entre componentes estructurales y las distintas actividades o propiedades de las moléculas, lo que puede ser útil para estimar (o predecir) estructuras altamente

activas. Estas metodologías se han empleado con éxito en la identificación de relaciones matemáticas entre estructuras peptídicas y la actividad antioxidante y antihipertensiva (Li and Li, 2013; Sagardia et al., 2013). Plataformas en línea, con modelos de esta característica, están disponibles recientemente como apoyo en la identificación de potencial antioxidante y antihipertensivo de fuentes proteicas inexploradas. Resaltan por su uso extendido: AHTpin, creada como un espacio virtual, basado en aprendizaje automático y AnOxPePred, en la cual, es posible predecir propiedades antioxidantes, como la capacidad para captar radicales libres (FRS) y para quelar metales. Además, de la base de datos de BIOPEP-UWM.

La finalidad del presente trabajo fue caracterizar el sistema de reacción de hidrólisis enzimática de plasma bovino, avanzando en el estudio de las propiedades bioactivas de los péptidos resultantes, a la luz del análisis de modelos matemáticos que aborden la complejidad de las reacciones enzimáticas de proteínas y que pueden ser empleados para comprensión de procesos de recuperación de fracciones peptídicas con actividad antioxidante y antihipertensiva. Todo esto a través de un estudio de la reacción de hidrólisis y la aplicación de técnicas de análisis confiables para la identificación, separación, secuenciación de péptidos y el apoyo de herramientas informáticas en el análisis de péptidos.

Los resultados muestran que es posible integrar el enfoque de análisis de datos experimentales (estudio de las curvas de hidrólisis), con el uso y verificación de modelos empíricos y modelos de fundamento cinético y conceptual. De igual forma, es posible utilizar la ecuación de balance de población, empleada en numerosas aplicaciones que contemplan dinámicas de formación y desaparición de componentes de variado tamaño y/o característica, en la predicción de la distribución de pesos moleculares de fracciones peptídicas de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino. Esto como alternativa a los modelos cinéticos basados en técnicas de agrupamiento (grupos definidos por fracciones peptídicas de peso molecular variable). La información de los pesos moleculares, sumado al análisis de las propiedades moleculares de los péptidos resultantes y el apoyo en técnicas *in silico* disponibles en línea, brindan información clave para mejorar la producción de fracciones ricas en péptidos con capacidad antioxidante y antihipertensiva.

1.2. MARCO TEÓRICO

1.2.1 Hidrólisis enzimática de proteínas

El proceso de hidrólisis de proteínas, ocurre cuando un enlace peptídico en la proteína, se rompe por acción del agua, en presencia de un catalizador ya sea de tipo químico o enzimático (Sierra-Lopera & Zapata-Montoya, 2021). Los primeros procesos usados fueron los de tipo químico, denominados hidrólisis química, se desarrollan por acción de sustancias ácidas o alcalinas. A pesar de ser de bajo costo, presentan problemas por su baja especificidad, por la desnaturalización de algunos aminoácidos y la baja reproducibilidad. En el caso del uso de enzimas, el proceso se denomina hidrólisis enzimática, la cual utiliza enzimas del tipo de las proteasas. Es un proceso más costoso que, sin embargo, presenta alta selectividad y especificidad por el sustrato. Es menos drástico, no deteriora los aminoácidos y es más reproducible y fácil de controlar (Tavano, 2013).

Las primeras etapas en la hidrólisis de proteína, entregan fragmentos de tamaño similar a la proteína nativa (oligómeros), lo que configura una reacción multisustrato, más aún cuando la proteína original, no es una proteína pura (Anna Trusek-Holownia et al., 2016), como en el caso de la sangre de bovino o sus derivados. El proceso de hidrólisis, además de reducir el peso molecular promedio de los fragmentos de proteína, aumenta su carga superficial, provoca la liberación de grupos hidrofóbicos y en general, modifica las características moleculares de la mezcla de proteínas en el sistema (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Lo cual es fundamental, teniendo en cuenta que el objetivo principal de este proceso es aumentar la recuperación de proteínas y el rendimiento en la obtención de componentes valiosos, con propiedades diferentes a la proteína original (Petrova et al., 2018).

Los hidrolizados de proteínas poseen propiedades nutricionales tales como, buena digestibilidad y absorción rápida, además de propiedades funcionales y actividades biológicas mejoradas en comparación a la proteína nativa (Intarasirisawat et al., 2014). Entre las actividades biológicas más importantes están la antihipertensiva, inmunomoduladora, antitrombótica, antioxidante, anticancerígena y antimicrobiana (Sánchez & Vázquez, 2017).

1.2.2 Físicoquímica de la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas

El proceso de hidrólisis enzimática produce la ruptura de los enlaces peptídicos por medio de la acción catalítica de las proteasas. Aquí se consume una molécula de agua y se libera un grupo carboxilo con uno amino, por cada enlace roto. Estos pueden estar más o menos ionizados dependiendo del pH de la reacción (Adler-Nissen, 1986) (Fig. 1.1).

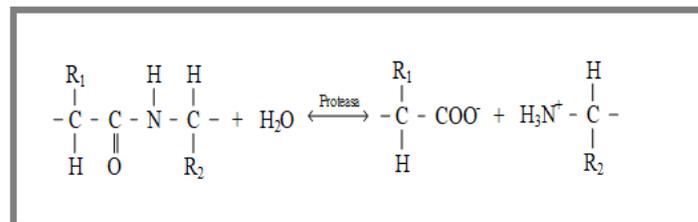
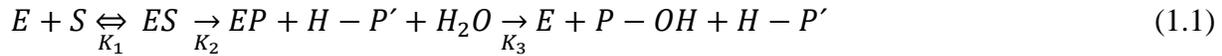


Fig. 1.1 Ruptura del enlace peptídico durante la reacción de hidrólisis enzimática.

En términos globales, la hidrólisis consiste en dividir la proteína en fragmentos de menor tamaño, los cuales, a su vez, son sustratos para la subsiguiente ruptura de enlaces peptídicos, con lo que se obtiene, una serie de rupturas simultáneas con especies de diferentes tamaños y propiedades químicas, en equilibrio (Benítez et al., 2008).

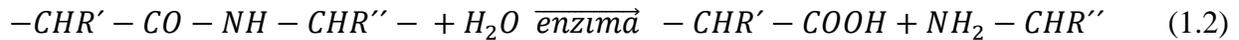
El proceso catalítico ocurre en tres etapas a saber: Primero la enzima (E) se aproxima al sustrato (S) y se une a este a través del enlace peptídico a escindir por intermedio del centro activo para formar el complejo enzima-sustrato (ES). Posteriormente, se presenta la ruptura del enlace peptídico y se libera el péptido. Finalmente, el péptido es separado de la enzima por medio de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. Cada una de estas etapas, con sus respectivas expresiones de velocidad, se muestran a continuación:



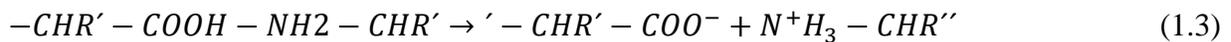
Donde: E: Enzima, S: Sustrato, P and P': Péptido resultante, k_x : Constante de velocidad de reacción.

La hidrólisis del enlace peptídico sigue los siguientes mecanismos (Adler-Nissen, 1986; Márquez & Vázquez, 1999).

Paso 1: Ruptura del enlace peptídico



Paso 2: Intercambio de protones



Paso 3: Titulación del grupo amino:



Como se mencionó, esta acción puede reiniciarse con los nuevos péptidos producidos o con solo uno de ellos, dependiendo de la especificidad de la enzima y algunos otros factores influyentes (la selectividad, la accesibilidad y la reactividad de la enzima por los nuevos potenciales sitios de enlace). En el caso de las proteínas globulares, se considera que, para lograr una adecuada hidrólisis, se debe realizar una desnaturalización paralela o previa. Si la proteína se desnaturaliza irreversiblemente antes de la hidrólisis, el número de enlaces disponibles se incrementa notablemente y la degradación de la proteína debería proceder de acuerdo a un tipo de reacción “cremallera”. Es decir, en esta fase, las moléculas de la proteína serán degradadas a intermedios, pero posteriormente son lentamente degradadas en productos finales de menor tamaño. En este tipo de reacción, se obtiene un hidrolizado que contiene principalmente péptidos de tamaño intermedio (Deng, van der Veer, et al., 2018). Para estas proteínas desnaturalizadas, otros factores, tales como la disminución de la solubilidad media, influyen en la velocidad de reacción inicial (Adler-Nissen, 1986).

1.2.3 Análisis de evolución de la reacción de hidrólisis enzimática

En análisis de la evolución de una reacción, se refiere a la determinación de las condiciones de avance de la reacción. Este avance, se puede medir en función de las características iniciales o sobre la base del cambio neto producido en la reacción. Generalmente se emplean algunos descriptores, como los mostrados en la Fig. 1.2. Con el uso de uno o más de estos descriptores, es posible ofrecer una caracterización más o menos completa de los productos y el sustrato en la reacción. Sin embargo, algunos se usan con menos frecuencia y en consecuencia no siempre se ofrece una descripción general completa de los sistemas de reacción.

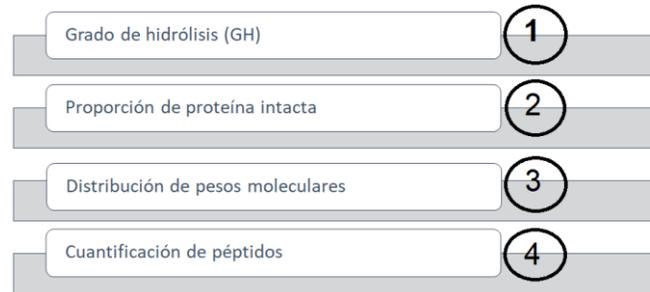


Fig. 1.2 Descriptores utilizados en el avance de reacciones de hidrólisis de proteínas.

1.2.3.1 Grado de hidrólisis (GH) y métodos de determinación

El GH, se expresa como la fracción o el porcentaje del número de enlaces rotos en un momento dado (h), respecto al total de enlaces peptídicos en la proteína nativa intacta (h_{tot}), ambos expresados como Equivalentes de proteína/Kg o mol de proteína/Kg (Sierra-Lopera y Zapata-Montoya, 2021).

$$GH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \cdot 100 \quad (1.5)$$

1.2.3.1.1 Método del pH-stat

Como puede apreciarse en Fig. 1.2, durante la hidrólisis del enlace peptídico, se liberan un grupo carboxilo y un grupo amino, los cuales en solución acuosa están más o menos ionizados en función del pH (Adler-Nissen, 1986), debido a que los pK del grupo N-terminal de los aminoácidos libres oscila entre 9-10.8 (Mat et al., 2018).

Este método se basa en el hecho de que bajo condiciones apropiadas de pH (alcalino o neutro), el grupo amino se disocia parcial o totalmente, mientras que el grupo carboxilo está completamente ionizado, liberando un protón (Mat et al., 2018). Con lo cual el pH desciende, provocando que el sistema se aleje de las condiciones óptimas para el desempeño de la enzima, lo que exige la adición de base para mantener el pH constante.

En este sentido, las moles de OH^- necesarias para neutralizar las moles de H^+ liberadas, son equivalentes a las moles de enlaces peptídicos rotos (Adler-Nissen, 1986).

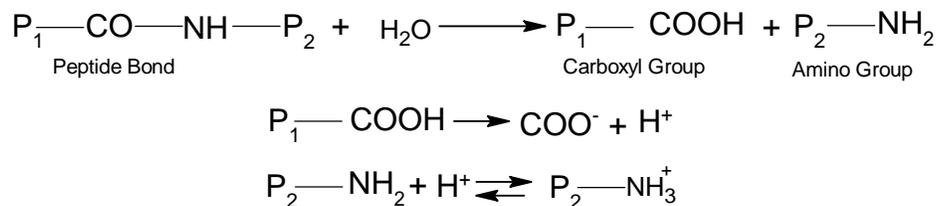


Fig. 1.3. Disociación de grupos amino y carboxilo en hidrólisis pH-stat de proteínas.

Sin embargo, la relación entre el GH y el consumo de base, depende además del pK del grupo α -amino liberado y la temperatura de la mezcla de reacción (1.6-1.8).

$$\text{GH} (\%) = \frac{BN_B}{M_P} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_{\text{tot}}} \cdot 100 \quad (1.6)$$

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad (1.7)$$

$$\text{pk} = 7,8 + \frac{298-T}{298 \cdot T} 2400 \quad (1.8)$$

Donde B es el volumen de base consumido en (en Litros) para mantener el pH constante, M_P es la masa de la proteína en kg, N_B es la concentración de la base (Eqv/L) y α es el grado de disociación de los grupos aminos liberados en la reacción. α como pK se calculan con las ecuaciones (1.7) y (1.8) respectivamente. En este caso T es la temperatura (K) (P. Valencia et al., 2015).

1.2.3.1.2 Método del ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) y del O-ftaldialdehído (OPA).

En estos métodos se derivatiza con ácido trinitro-benzenosulfónico en el primer caso y con orto-ftaldialdehído en el segundo, los grupos α -amino liberados durante la reacción de hidrólisis, como se muestra en la Fig. (1.4) (Rutherford, 2010). Posteriormente, se analizan por espectrofotometría en el rango ultravioleta-visible para el método TNBS o fluorescente para el OPA. La curva de calibración se elabora usualmente con leucina.

El GH corresponde al porcentaje de aminoácidos liberados respecto a los aminoácidos en la proteína nativa (Adler-Nissen, 1986).

La falencia en estos dos métodos radica en la falta de precisión, debido a que los reactivos de derivatización pueden reaccionar de manera diferente en función del aminoácido implicado. Por ejemplo, en el método OPA, se producen variabilidades cuando los hidrolizados contienen elevados niveles de prolina y cisteína (Wubshet et al., 2019).

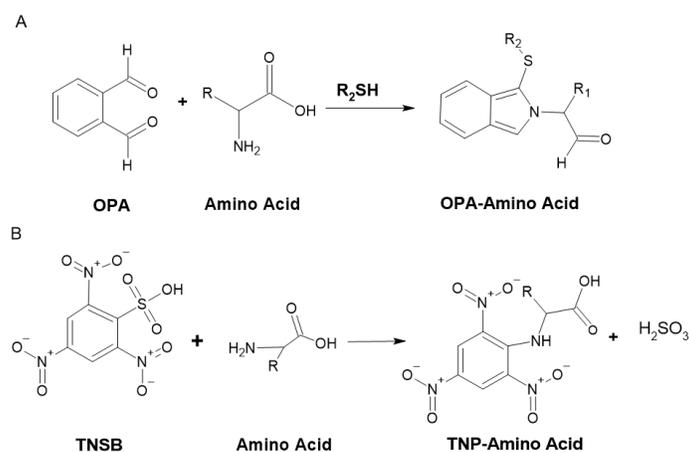
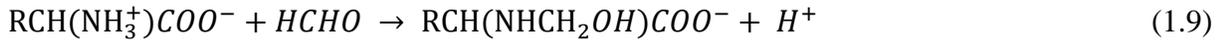


Fig. 1.4 Reacción de los grupos α -amino con A) OPA y B) TNBS

1.2.3.1.3 Titulación con formol

Este método se basa en la determinación del número de protones liberados, medidos por la cantidad de base gastada en la titulación. En este caso la titulación se lleva a cabo por medio de una reacción entre los grupos amino y el formaldehído (Rutherford, 2010).



Esta reacción (1.9-1.10), se presenta tanto a pH neutro como alcalino, dando como resultado la liberación de protones y una reducción concurrente del valor del pKa del aminoácido – formaldehído producido. La titulación se puede realizar de manera directa o indirecta. En la primera, se agrega formaldehído directamente a la solución de muestra antes de realizar la valoración con la base. En la segunda, la solución de muestra se ajusta primero al pH antes de agregar el formaldehído, sin embargo, la técnica directa da mejores resultados en términos de reproducibilidad (Wubshet et al., 2019).

1.2.3.1.4 Método del nitrógeno soluble en ácido tricloroacético (TCA)

También denominado índice de solubilidad en ácido tricloroacético. En este método no se detecta la cantidad de enlaces peptídicos escindidos, sino que se mide la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético, suponiendo que proviene exclusivamente de aminoácidos y péptidos pequeños. El valor del índice de solubilidad del ácido tricloroacético se determina precipitando la proteína no hidrolizada con ácido tricloroacético, seguido de centrifugación. Así, el índice de nitrógeno soluble en TCA del hidrolizados se expresa como la proporción porcentual del contenido de nitrógeno del sobrenadante y del contenido en la muestra original (Rutherford, 2010).

1.2.3.1.5. Método Isométrico

En este método, se establece la relación entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados y la osmolaridad de la mezcla de reacción, calculada usando la ecuación (1.11) (Rutherford, 2010).

$$GH = \frac{DC}{(S\% * f_{osm})} * \frac{1}{\omega} * \frac{1}{h_{tot}} * 100 \quad (1.11)$$

Donde DC es la Osmolaridad de la mezcla (mOsm/kg), S% la concentración de sustrato, f_{osm} el factor de conversión calculado con base en el contenido (%) de materia seca del sustrato (DM) (1.12). h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos (mM/g de proteína) y ω el coeficiente osmótico para péptidos (Rutherford, 2010).

$$f_{osm} = \frac{1000}{(100 - DM)} \quad (1.12)$$

1.2.3.2 Determinación de proteína intacta

El análisis de la evolución de una reacción de hidrólisis a través de la determinación del remanente de proteína intacta es una manera útil, aunque poco frecuente de verificar la evolución de una reacción de este tipo. Esta estrategia, exige la utilización de un método químico para la determinación de la concentración efectiva de la proteína (s) digerida (s).

Se han empleado métodos de cromatografía líquida de fase reversa HPLC-RP y UHPLC-RP usando estándares de calibración y distribución de tamaños moleculares HPLC-SE. A través de la determinación, se pueden evaluar modelos matemáticos con el ajuste del sustrato y la determinación de constantes cinéticas. Además, de determinar el comportamiento cinético basado en la teoría de Linderstrøm-Lang sobre la hidrólisis de proteínas. Esta teoría, expone que el proceso de ruptura de proteínas puede seguir uno de dos mecanismos: one-by-one (uno a uno) y zipper (cremallera). De acuerdo con las velocidades de reacción (v_0 y v_1) en Fig.1.5. El mecanismo one-by-one, es característico cuando la etapa reversible es determinante en la velocidad de reacción, lo que genera poca presencia de productos intermedios, en tanto que la hidrólisis ocurre desde el sustrato uno a uno para dar productos. Por otra parte, un mecanismo zipper (cremallera) se presenta cuando el paso de desnaturalización es muy rápido y la generación de productos intermedios es lenta, entonces, la proteína nativa es rápidamente convertida a productos intermedios (Deng, Butré, et al., 2018).

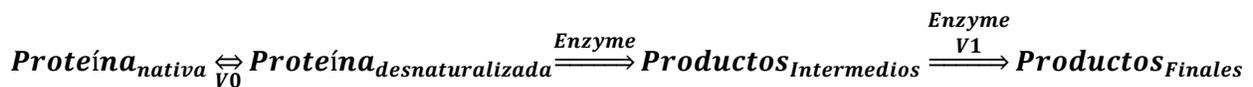


Fig. 1.5 Mecanismos de hidrólisis propuestos por Linderstrøm-Lang: one-by-one zipper (cremallera).

1.2.3.3 Distribución de pesos moleculares

Cuando un enlace peptídico de una proteína de tamaño (W), es escindido por hidrólisis enzimática, se obtienen (n) fracciones peptídicas de tamaño ($q \ll W$). La cantidad de fracciones obtenidas dependerá de la dinámica de ruptura del enlace, que se asocia con la especificidad y selectividad de la enzima usada en la reacción. Dos fracciones hidrolizadas, con similar GH, no siempre tienen la misma distribución de pesos moleculares (Deng, Butré, et al., 2018) y ciertamente, esto es debido a que no se tienen siempre las mismas concentraciones de péptidos en el sistema (P. Valencia et al., 2014a). Una forma común de distinguir los componentes entre muestras de estos sistemas, es determinar la distribución de pesos moleculares, para lo cual, generalmente se usan técnicas de exclusión por tamaño SEC (Shi et al., 2005).

Cromatografía líquida de exclusión por tamaño (HPLC-SE) fue usada por Shi et al., (2005), como estrategia de cuantificación de fracciones peptídicas en el desarrollo de un modelo matemático basado en técnicas de agrupamiento (grupos definidos por fracciones peptídicas de peso molecular variable para cada tiempo de reacción), usado para predecir satisfactoriamente la distribución de pesos moleculares para distintas temperaturas y valores de pH. En aplicaciones tecnológicas en el diseño de alimento se usó recientemente una estrategia que combina el GH y los cambios en la distribución del peso molecular como indicadores de potencial alergénico reducido en hidrolizados enzimáticos de asilados de proteínas de guisante, empleando varias enzimas comerciales (García Arteaga et al., 2020).

1.2.3.4 Identificación de péptidos

Muchas aplicaciones requieren de la identificación e incluso cuantificación de péptidos, obtenidos tras la hidrólisis. La identificación es una forma de caracterizar los hidrolizados en la búsqueda de aplicaciones y es especialmente útil cuando se requiere identificar péptidos relacionados con una actividad específica. Generalmente, los péptidos son separados por cromatografía líquida -LC- antes de la detección por espectrometría de masas (MS) cuando se usa UHPLC-MS-MS o bien los hidrolizados primero se separan en fracciones, después de lo cual todos los péptidos en cada fracción se analizan simultáneamente empleando MALDI-TOF-MS. Los espectros de MS y MS-MS se comparan con librerías dispuestas en bases de datos que usan sus propios algoritmos. En el campo de la proteómica existen varios algoritmos aplicados en la tarea de identificación automática de los péptidos basados en fragmentos de MS/MS como, por ejemplo: MASCOT, SEQUEST o Andrómeda, las cuales tienen funciones de puntuación incorporadas, lo cual es importante en la confianza de la identidad del analito (Vreeke et al., 2022).

En las estrategias de cuantificación de estos péptidos, se usa la información de espectrometría de masas, relacionada con la intensidad de MS de los iones. Intensidad que está relacionada por aspectos como: “la supresión de iones, los efectos de la matriz la variación en los estados de carga y las diferencias diarias en la intensidad absoluta” (Vreeke et al., 2022). En el campo de la hidrólisis enzimática de proteína, generalmente existe interés por comprender la relación que existe, entre las condiciones de operación y los péptidos presentes en una porción del hidrolizados con alguna actividad evaluada (casi siempre con técnicas *in vitro*). Otro enfoque común son las técnicas de modelamiento cinético, que incluyen discriminación de péptidos, como herramienta de análisis en la comprensión de los fenómenos asociados a la hidrólisis y las velocidades de formación de péptidos con potenciales aplicaciones alimentarias o farmacéuticas (Fernández et al., 2013; Muñoz-Tamayo et al., 2012a).

1.2.4 Características más importantes de las proteasas

Las proteasas son las enzimas responsables de catalizar la reacción de hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, también son conocidas como peptidasas. A pesar de que muchas, se pueden obtener a partir de plantas o animales, la mayoría de las proteasas comercialmente viables se obtienen de microorganismos (Raveendran et al., 2018). En especial de *Bacillus*, como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* y hongos *Aspergillus* como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* y *A. oryzae* (P. Singh & Kumar, 2019).

Las proteasas pertenecen al grupo de las hidrolasas, constituyen un grupo amplio y complejo de enzimas, las cuales se diferencian entre sí en su especificidad por el sustrato, su selectividad, la naturaleza de sus sitios activos, su mecanismo catalítico, su perfil de estabilidad, su pH y temperatura óptima. Por estas razones, las proteasas no pueden clasificarse con el sistema general de nomenclatura enzimática, por el contrario, se clasifican según su acción catalítica, la naturaleza de su sitio activo y su valor de pH óptimo.

1.2.4.1. Clasificación según los grupos funcionales del sitio activo

Desde el punto de vista de los grupos funcionales que tengan en su sitio activo, las proteasas se pueden clasificar en cuatro grupos principales como sigue (Rao et al., 1998).

1.2.4.1.1. Serina proteasas

Se caracterizan por la presencia de un grupo serina en su sitio activo. Son numerosas y se extienden entre virus, bacterias y eucariotas, lo que sugiere que son vitales para estos organismos. Estas proteasas son generalmente activas a pH neutro y alcalino, con un pH óptimo entre pH 7 y 11, con puntos isoeléctricos entre pH 4 y 6. Con pesos moleculares que oscilan entre 18 y 35 kDa. Además, tienen amplias especificidades por sustrato, incluyendo actividad esterolítica y amidasa (Q. Li et al., 2013; Rao et al., 1998).

1.2.4.1.2. Aspártico proteasas

Las proteasas de ácido aspártico, comúnmente conocidas como proteasas ácidas, son las que dependen de los residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica. La mayoría muestran una actividad máxima a pH bajo (pH 3 a 4), y con pesos moleculares en el rango de 30 a 45 kDa. Las fuentes más conocidas de este tipo de proteasas son el estómago (para pepsina, gastricina y quimosina), lisosomas (para catepsinas D y E), riñón (para renina), gránulos de levadura y hongos (para proteasas secretadas como rizopuspepsina, penicillopepsina y endotiapepsina) (Rao et al., 1998).

1.2.4.1.3. Cisteína proteasas

Su actividad depende de una díada catalítica que consiste en cisteína e histidina. En general, estas enzimas son activas solo en presencia de agentes reductores como HCN o cisteína y tienen su actividad máxima a pH neutro, aunque algunas de ellas, por ejemplo, proteasas lisosomales, son máximamente activas a pH ácido. A este grupo pertenece la papaína, siendo la cisteína proteasa más conocida (Rao et al., 1998).

1.2.4.1.4. Metaloproteasas

Su principal característica es que requieren iones metálicos divalentes para su actividad. Incluyen enzimas de diversos orígenes, como colagenasas de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de venenos de serpiente y termolisina de bacterias (Ramli et al., 2022; Rao et al., 1998).

1.2.4.2. Clasificación según el punto de escisión de la cadena polipeptídica

Con base en el sitio de escisión de la cadena polipeptídica, las proteasas se clasifican en exopeptidasas y endopéptidasas (Martínez-Medina et al., 2019).

1.2.3.2.1. Endopeptidasas

Actúan en los enlaces peptídicos internos de la proteína, generando cadenas peptídicas cortas. Se dividen en Serina proteasa, Cisteína proteasa, Metaloproteasa, Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido.

1.2.4.2.2. Exopeptidasas

Actúan sobre los enlaces peptídicos terminales de la proteína, ya sea en el extremo terminal amino (aminopeptidasa) o carboxilo (carboxipeptidasas), dando como resultado aminoácidos libres. Las aminopeptidasas se denominan Aminopeptidasas, Dipeptidil peptidasa y Tripeptidil peptidasa, dependiendo de si cortan uno, dos o tres aminoácidos respectivamente. Mientras que las carboxipeptidasas se denominan Carboxipeptidasa o Peptidil dipeptidasa, dependiendo si cortan uno o dos aminoácidos, respectivamente. También en las carboxipeptidasas se pueden encontrar Serina proteasa, Metaloproteasa proteasa y Cisteína proteasa, además de enzimas que cortan péptidos de dos aminoácidos (dipeptidasas).

1.2.4.3. Clasificación según el pH óptimo

Con base en su rango de pH óptimo, las proteasas se pueden clasificar en alcalinas, neutras y ácidas. Las proteasas ácidas poseen su mayor actividad entre pH 2 y 6, y están generalmente constituidas entre 380 a 420 aminoácidos, y diferentes residuos de aminoácidos constituyen el sitio activo, perteneciendo principalmente a este grupo las aspártico proteasas, algunas cisteínas proteasas y metaloproteasas. Las proteasas neutras, como su nombre lo indica, tienen una actividad óptima a valores de pH cercanos a la neutralidad, en esta clasificación se incluyen la cisteína (Martínez-Medina et al., 2019).

1.2.5 Proteasas y sus aplicaciones en la Industria Alimentaria

Enzimas de distintos fuetes se usan con relativo éxito en la industria de la producción y el procesamiento de los alimentos. En particular se ha dado un desarrollo interesante en la producción de enzimas que son usadas en hidrólisis enzimática de proteínas alimentarias con la finalidad de mejorar propiedad funcional y la producción de hidrolizados de proteínas/péptidos bioactivos nutraceuticos (Tapal & Tiku, 2019). La industria de la producción de enzimas comerciales es una industria en constante crecimiento. El desarrollo de nuevas tecnologías en la producción de enzimas (aislamiento, purificación y caracterización) y el avance científico en las distintas aplicaciones en sectores variados de la industria alimentaria, hace posible que, cada vez más enzimas sean utilizadas comercialmente. Las proteasas son las principales en cuanto a sus usos industriales y representan el 60 % del comercio mundial total de enzimas (Ahangari et al., 2021). Por lo general las proteasas, son obtenidas de fuentes: animales (pancreatina, tripsina y pepsina), vegetales (papaína, ficina, bromelina) o microbianas (subtilisina). Debido a distintos aspectos como los beneficios obtenidos tras una producción simple, económica y consistente, las enzimas de origen bacteriano, de algas, hongos y levaduras se producen a gran escala (Kuddus, 2019) y son preferidas en las aplicaciones de hidrólisis de proteínas, por las mejoras demostradas en relación con las de otras fuentes (Ramli et al., 2022).

Pese al éxito mostrado en el uso de enzimas en estas aplicaciones, es cierto que, esta es aún, una tecnología con dificultades por resolver. Cambios pequeños en la estructura proteica de las proteasas genera fuertes efectos a la función enzimática, por lo cual, factores relacionados con las condiciones de operación (T, pH, Tiempo, agitación, presencia de sales, entre otros aspectos), además de factores como la presencia de inhibidores, necesidades de cofactores y los fenómenos

de autólisis (Tavano, 2013), siguen siendo aspectos de orden prioritario para mejorar la eficiencia en el uso de proteasas.

Preparaciones enzimáticas comerciales (por ejemplo, Alcalase, Flavourzyme, Neutrase y Protamex) que, entraron al mercado de la industria de alimentos, como coadyuvantes para inducir cambios de sabor y textura en los alimentos procesados, recientemente, ganaron importancia en la obtención de péptidos bioactivos (Chew et al., 2019). Un gran número de alimentos y subproductos alimentarios, ricos en proteína, han sido usados como fuentes en la hidrólisis con estas proteasas con el fin de producir, péptidos bioactivos que pudieran tener interés en el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles, como la hipertensión arterial y el cáncer. Los resultados hasta ahora evaluados parecen ser prometedores (Chew et al., 2019).

Mejorar las capacidades de las enzimas para operar en condiciones adversas de temperatura y pH, es un área de trabajo de gran interés científico. Técnicas de evolución asistida en laboratorio, se han empleado con el fin de mejorar las enzimas y su operación en variadas aplicaciones. Los enfoques básicamente contemplan: generación de diversidad genética (mutagénesis aleatoria) y selección para la función utilizando parámetros específicos (Tao & Cornish, 2002). Estos desarrollos han estado fuertemente apoyados por los avances en el campo de química computacional y la generación de modelos moleculares (Tavano, 2013).

En condiciones óptimas de pH y temperatura las proteasas, como las hidrolasas, son capaces de escindir enlaces péptidos específicos en posiciones indicadas de una cadena proteica, produciendo una serie de péptidos y aminoácidos libres. Las enzimas provenientes de animales tienden a ser más específicas en los sitios de acción si se comparan con las de origen vegetales. La pepsina, por ejemplo, puede hidrolizar enlaces de fenilalanina o leucina, mientras que la papaína tiene una amplia especificidad, escindiendo enlaces en fenilalanina, arginina y lisina. La tripsina por su parte, estabiliza e hidroliza residuos de lisina y arginina del lado carboxilo de una cadena. La mejora continua en el campo de la ingeniería de proteínas y el desarrollo de la proteómica, permite que sea posible producir estas proteasas con una especificidad única y/o una estabilidad mejorada a temperatura o pH elevados o en presencia de detergentes y para comprender las relaciones estructura-función de la enzima (Rao et al., 1998).

Las enzimas obtenidas de bacterias, presentan enormes ventajas en los procesos de producción, teniendo en cuenta la versatilidad en la manipulación a nivel genético (permite modificaciones para mejoras) y alta tasa de reproducción en pocos espacios. Las bacterias del género *Bacillus* son las principales productoras de proteasas extracelulares, siendo *Bacillus subtilis* la más usada en los sectores industriales (Ahangari et al., 2021; Pant et al., 2015).

La presencia en el mercado de la industria de alimentos de un gran número de preparados enzimáticos comerciales con alta eficiencia operativa, ha permitido el avance científico en materia de identificación de péptidos con propiedades bioactivas y puesto que el enfoque de este trabajo de investigación es, el análisis de la influencia de las condiciones de operación sobre aspectos de la cinética que impactan la producción de péptidos antioxidantes y antihipertensivos. En la tabla (1.1) se detallan algunas de las investigaciones relevantes aplicados a la obtención de péptidos bioactivos.

Tabla 1.1 Aplicaciones de enzimas comerciales para la hidrólisis de proteínas de distintas fuentes (obtención de péptidos bioactivos o modelamiento cinético de la reacción).

ENZIMA / ENZIMAS	SUSTRATO	ACTIVIDAD	RESULTADOS	REFERENCIA
Alcalasa	Proteína de soja	Inmunoreguladora	Péptidos inmunoreguladores Identificando por UHPLC-MS/MS 85 péptidos y 84 con actividad inmunoreguladora.	(L. Wen et al., 2022)
Pepsina	Proteínas de frijol negro (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Antioxidante	A 120 min se obtuvo un hidrolizado con capacidad antioxidante (DPPH).	(Do Evangelho et al., 2016)
Alcalasa, Flavourzyme y neutrasa	Salvado de arroz	Antioxidante	Alcalasa a 2h de operación fue la más efectiva generando fracciones (6kDa) con alta actividad antioxidante.	(Thamnarathip et al., 2016)
Papaína, bromelina y proteasa neutra bacteriana	Proteína de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Mezcla de bioactividades	Utilizando papaína al 7,130% se logra obtener un rendimiento del 95,5% respecto al volumen inicial de masa hidrolizada. Fracciones ricas en: tirosina, triptófano y fenilalanina	(Landeros-Soriano et al., 2018)
Bromelina	Hongos King Boletus	Antioxidante/Inhibitoria de ECA	Tres nuevos péptidos (SETGGGHTTSCETDLGEFL, AAPLPGP y GTDPTGEMLT) con alta capacidad antioxidante y moderada actividad inhibitoria de la ECA. Seis nuevos péptidos (DLDLLEKGIRKT, NGGNAPI, VSWNVLQEP, DTGRGLGASH, IDNLDNLIKL y LIYAQGFSA) tenían una capacidad antioxidante moderada y la mayor actividad inhibitoria de la ECA.	(Kaprashvili et al., 2022)

1.2.5.1 Alcalasa (subtilisina)

Es una enzima comercial lanzada al mercado por Novozymes en la década de los sesentas (Tacias-Pascacio et al., 2020), inicialmente con aplicaciones en la industria de detergente y cuero (S. Singh & Bajaj, 2017). En la clasificación de proteasa, Alcalasa es una “serina endoproteinasa”, denominadas así por la presencia de un grupo de serina en el centro activo. Hace parte del grupo de las subtilisinas (SB) caracterizada por una tríada de sitios activos compuesta por Ser221, His64 y Asp32. En principio se obtuvo de *Bacillus subtilis* y se denominó "Subtilisin Carlsberg". Actualmente, Alcalasa, se produce a través de la fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis* (Tacias-Pascacio et al., 2020). También es denominada subtilisina A y se trata de una enzima alcalina con temperaturas de trabajo entre 45°-65°C y pH entre 7,5-11, dependiendo del tipo de sustrato. Tiene un peso molecular de 27,3 kDa y está compuesta de un polipéptido de única cadena de 275 residuos de aminoácidos (Rao et al., 1998).

La Alcalasa ha encontrado un amplio campo de aplicación en el mejoramiento de alimentos, especialmente en lo relacionado con la producción de hidrolizados de proteínas, donde se ha estado usando desde los años setentas. El preparado comercial, denominado “Alcalase” es una marca registrada de Novozymes Corporation y consiste en una presentación líquida de color marrón, compuesta de aproximadamente: 50 % (p/p) de glicerol, 41 % (p/p) de agua y 9 % (p/p) de extracto

de proteasa de *Bacillus licheniformis* (Tacias-Pascacio et al., 2020). Su actividad se expresa en Unidades Anson (AU) y las presentaciones usuales en el mercado son: 2,4-2,9 y 0,6 AU-U/g.

Basados en la nomenclatura de subsitios, Schechter y Berger (Schechter & Berger, 1967) la especificidad de la enzima se explica teniendo en cuenta el modelo de la Fig.(1.6). En el cual se muestra que, los residuos de aminoácidos en una cadena polipeptídica que está siendo sometida a la acción de la enzima, se enumeran como: P1, P2, P3, P4, etc., para el caso de los aminoácidos dispuestos en la dirección N-terminal contados desde la posición susceptible de escisión P1. Entretanto, los residuos ubicados en la posición C-terminal se denominan P1', P2', P3', P4', etc.

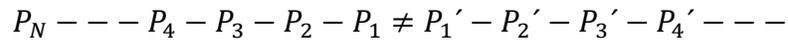


Fig. 1.6 Nomenclatura de subsitios según Schechter y Berger para el sitio catalítico de una proteasa clásica.

A diferencia de muchas otras enzimas de origen animal, Alcalasa presenta, una amplia especificidad y selectividad debido al gran número de aminoácidos que puede reconocer en la escisión de una cadena proteica. En particular, esta enzima tiene preferencia a la ruptura de los enlaces peptídicos cuando los aminoácidos Glu, Met, Leu, Tyr, Lys y Gln se colocan en P1 del sitio catalítico. Esta preferencia mejora cuando un residuo de Glu se ubica en posición P1, al mismo tiempo que un aminoácido hidrofóbico está posicionado en P2' o P3' (Rao et al., 1998).

El esquema simple, para explicar un paso de la catálisis enzimática de una proteína, contempla la formación de un complejo (ES), denominado complejo de Michaelis-Menten. La evidencia muestra que, los procesos implícitos en la catálisis de este complejo, pasan por la formación de un intermedio acilo (ES'), seguido por la liberación de la enzima y la consecuente formación del dos productos (dos porciones de la cadena). Se cree, además, que la formación y desaparición de este intermedio acilo, está relacionado con un intermedio tetraédrico. Lo cual implica que, la aparición o desaparición de este intermedio tetraédrico (ver Fig. 1.7), es el paso limitante en la velocidad de catálisis enzimática en la serina proteasas. El estudio de este intermedio es experimentalmente posible a través de su analogía con los intermedios acilos formados entre la enzima e inhibidores (Petrillo et al., 2012).

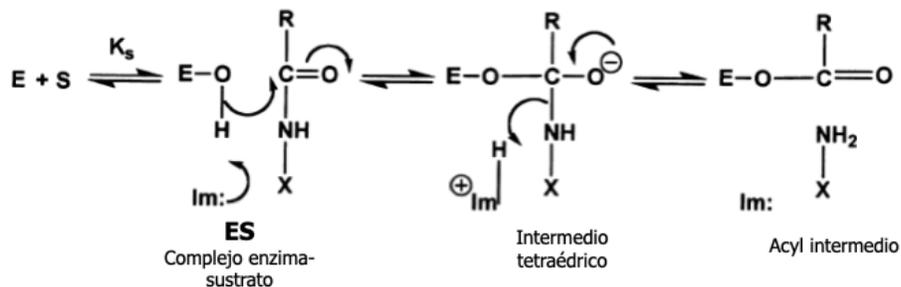


Fig. 1.7 Formación del Intermedio Acyl de una Serino-proteinasa

En la tabla 1.2 se muestran distintas aplicaciones de hidrólisis de proteínas en las cuales se ha usado Alcalasa comparada con otra enzima y se ha puesto en evidencia la ventaja o desventaja en su utilización.

Tabla 1.2. Uso de Alcalasa comparado con otras enzimas para la obtención de péptidos antioxidantes y antihipertensivos de distintas fuentes proteicas.

ENZIMA	SUSTRATO	ACTIVIDAD	RESULTADO DESTACADO	REFERENCIA
Pepsina, pancreatina, alcalasa y flavorzyme	Pepino de mar (<i>Isostichopus badiionotus</i>)	Antihipertensiva	El sistema Alcalasa-flavorzyme generó el GH más alto para 90 min (fracción inhibidora de la ECA).	(Chim-Chi et al., 2017)
Alcalasa y protamex	Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Antioxidante	El hidrolizado con Alcalasa exhibió una actividad antioxidante significativa ($p < 0,05$) más alta contra el radical DPPH y mostró la mayor competencia antioxidante <i>in vitro</i> contra los radicales de piróxilo.	(Zamora-Sillero et al., 2017)
Alcalasa y Flavourzyme	Proteína de suero	Antioxidante y antimicrobiana	Los hidrolizados de Alcalasa mostraron mayores actividades antioxidantes que otros hidrolizados.	(de Souza et al., 2019)
Neutrasa, alcalasa, savinasa, elastasa, termolisina y tripsina.	β -lactoglobulina	Antioxidante	Hidrolizado obtenido bajo alta presión hidrostática y la hidrólisis de Alcalasa tenían propiedades antioxidantes significativamente más altas respecto que las otras cinco enzimas analizadas.	(Bamdad et al., 2017)
Papaína, alcalasa, bromelina	Leche de camello	Antihipertensivas y antiinflamatorias	Aumento dramático en la actividad inhibitoria la ECA y antiinflamatoria se produce en hidrolizados de proteína de leche de camello.	(Mudgil et al., 2019)

1.2.6 Sangre Bovina (sustrato utilizado en el estudio).

La sangre bovina es por definición el líquido de color rojo que circula por el sistema circulatorio del cuerpo del bovino y que cumple con importantes funciones fisiológicas como la de distribuir el oxígeno, los nutrientes y otras sustancias a las células del organismo; así como recoger de estas los productos de desecho. La sangre bovina se compone de una parte líquida denominado plasma y de células en suspensión como hematíes, leucocitos y plaquetas. La sangre recuperada en los procesos de beneficio, tiene una serie de usos importantes, a través de la transformación industrial, que incluyen el consumo humano (alimenticio y farmacéutico), así como, el consumo animal, entre otras aplicaciones (Norma Oficina Nacional de Normalización H.C., 2009). El sacrificio de ganado generalmente incluye subproductos como recorte, huesos, piel y sangre; siendo este último uno de los subproductos líquidos con alto valor biológico.

1.2.6.1 Propiedades y composición de la sangre bovina.

La sangre es un elemento común en todos los organismos, pero factores como la raza del animal, su edad, estado fisiológico y su alimentación, etc., pueden provocar ligeros cambios en la

composición química de esta. Sin embargo, se puede establecer una composición media: 80% agua, 18% de proteínas y 2% de hidratos de carbono, lípidos y sales minerales, en donde el plasma representa del 60 al 65% del total y las células en suspensión o paquete celular representan del 35 al 40% (Linden & Lorient, 1996).

Tabla 1.3. Composición de la sangre, plasma líquido y paquete celular bovino (g/100mL)

COMPONENTE	Sangre (%)	Plasma (60%)	Paquete celular (40%)
Agua	80-85	90-92	70-78
Proteína	15-18	6-8	25-29
Lípidos	0,15	0,5-1	0,20
Hidratos de carbono	0,10	0,08-0,12	---
Sales Minerales	1,00	0,8-0,90	Trazas
Otras Sustancias	0,55	0,20-0,30	---
Materia Seca	15-20	8-10	22-30

El plasma es una sustancia compleja, su componente principal es el agua, es de color ámbar y su intensidad varía de acuerdo a la presencia de pigmentos biliares (bilirrubina), carotenos y otros pigmentos. También contiene proteínas plasmáticas, sustancias inorgánicas (como sodio, potasio, cloruro de calcio, carbonato y bicarbonato), azúcares, hormonas, enzimas, lípidos, aminoácidos y productos de degradación como urea y creatinina. Estas últimas sustancias aparecen en pequeñas cantidades. Entre las proteínas plasmáticas se encuentran la albúmina, principal agente responsable del mantenimiento de la presión osmótica sanguínea y, por consiguiente, controla su tendencia a difundirse a través de las paredes de los vasos sanguíneos; una docena o más de proteínas, como el fibrinógeno y la protrombina que participan en la coagulación. En la tabla 1.3, se muestra la composición aproximada de nutrientes en el plasma y el paquete celular (Linden & Lorient, 1996).

1.2.6.2 Seroalbúmina Bovina (BSA).

La BSA se encuentra en el suero sanguíneo en una concentración aproximada de 0,3 g/L. Consiste en una cadena de 582 aminoácidos, de peso molecular aproximado de 66.200 Da. Contiene 17 puentes disulfuro y un grupo tiol libre. Tiene una estructura secundaria compuesta casi en su totalidad por hélices α y su estructura terciaria es de tipo globular. Está compuesta por tres dominios homólogos (I, II y III)(H. Xu et al., 2013). Se han encontrado estructuras como monómero y como dímero, pero polimerizaciones de mayor grado no parecen comunes(Jr, 1995). Es una proteína de baja estabilidad térmica, por lo que se desnaturaliza fácilmente. Tiene tendencia a unirse a otras moléculas, principalmente a ácidos grasos, esto le sirve de protección frente al ataque enzimático y a la desnaturalización térmica (Schlimme & Buchheim, 2002).Tiene la función de transportar en el cuerpo fármacos, nutrientes, metales y otras moléculas. Posee muchas otras funciones debido a su gran capacidad de unión con ligandos. Esta proteína, posee dos residuos de triptófano (Trp134 y Trp213) que proporcionan fluorescencia intrínseca a la molécula.

1.2.6.3 Inmunoglobulinas (Ig)

Se conocen cinco clases distintas de moléculas de inmunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las cuales difieren en tamaño, carga, composición de aminoácidos y contenido en carbohidratos. Dichas clases o isotopos de inmunoglobulinas vienen marcadas por el tipo de cadena pesada que contienen; cada una se destaca por diferentes funciones y procesos efectores. Así, La función de la IgA es actuar frente a posibles infecciones por microorganismos patógenos en la mucosa intestinal. Los anticuerpos IgM e IgG están dirigidos contra los antígenos de superficie de la bacteria y contra las toxinas, siendo IgG el más dominante, el cual recubre los microbios y los transforma en el objeto de la fagocitosis (J. Zhang et al., 2022)

La IgG es una glicoproteína monomérica que existe en forma de polímero y de monómero en forma de “Y”. Se trata de una serie de proteínas con funciones bioactivas y asociadas a funciones inmunitarias. Compuesta de una cadena ligera (del tipo κ y γ) con 214 residuos de aminoácidos y un peso molecular de unos 25 kDa. Además, tiene dos cadenas pesadas de entre 450-550 residuos y unos 50-75 kDa (del tipo α , γ , μ , δ y ϵ , correspondiente a cinco tipos de Ig: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE, respectivamente)(J. Zhang et al., 2022).

1.2.7 Producción de péptidos bioactivos

En definición, un péptido bioactivo es cada fragmento producido por escisión de un enlace peptídico en una cadena proteica que, al ser consumido por los seres humanos, tiene la capacidad de producir efectos benéficos para la salud, debido, tanto al impacto de su valor nutritivo, como a las funciones biológicas ejercidas a nivel celular en el cuerpo (Bhandari et al., 2020). Según un reporte de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos, la investigación sobre componentes bioactivos de origen alimentario constituye un área focal clave en la investigación futura para mejorar la salud humana a través de la nutrición (Korhonen & Pihlanto, 2006). En la escisión, a través de hidrólisis, de las cadenas proteicas, influyen numerosos factores: El origen de la proteína, tratamiento previo al sustrato y la naturaleza química de la enzima empleada. Además de las condiciones en las cuales ocurre la reacción (el papel del pH, los niveles de enzima y sustrato, la Temperatura del medio, la fuerza iónica, entre otras)(Karami & Akbari-adergani, 2019). Estos factores, definen la eficiencia de operación de los sistemas de reacción y condicionan aspectos como, la naturaleza química de las unidades peptídicas a formar y por lo tanto su potencial utilización.

Los péptidos bioactivos son péptidos cortos de aproximadamente 2-30 amino ácidos de longitud. Están inactivos dentro de la secuencia de la proteína orinal y pueden ser liberados durante la digestión gastrointestinal durante el metabolismo de alimentos o por hidrólisis con enzimas purificadas (Di Bernardini et al., 2011a), en esquemas de producción *in vitro* (controlando variables influyentes). Estos péptidos con actividad biológica han sido aislados a partir de proteínas de varias fuentes, como leche, sardina, maíz, soja, huevo, gelatina, arroz, pescado, etc (Karami & Akbari-adergani, 2019). Actualmente, existen varias tecnologías para el aislamiento y purificación a escala piloto de péptidos bioactivos atendiendo al tamaño molecular. Se destacan las técnicas cromatográficas y de separación por membrana (ultra y nanofiltración)(Li-Chan, 2015).

1.2.7.2 Péptidos antioxidantes

Cuando un organismo se expone a sustancias y ambientes adversos puede resultar un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el sistema biológico y el sistema de defensa antioxidante. Esto puede inducir cambios a nivel tisular (Lv et al., 2022). Estos desbalances provocan que especies reactivas generen daños a proteínas, lípidos y el ADN, lo cual condiciona el desarrollo de una serie de enfermedades crónicas (P. Li et al., 2022). Si la energía del radical es alta cualquiera de los 20 aminoácidos que conforman las proteínas naturales, pueden reaccionar con este. Entre estos se destacarían los más reactivos como los azufrados, los aromáticos y los que contienen anillo imidazol. Sin embargo, se ha comprobado que en forma libre, estos aminoácidos tienen una pobre capacidad antioxidante en sistemas biológicos reales (Sarmadi & Ismail, 2010). En contraste, cuando estos conforman estructuras peptídicas de tamaño molecular pequeño, potencian esta capacidad y se convierten en verdaderos y potentes agentes antioxidantes.

En las cadenas proteicas existen una serie de secuencias específicas con el potencial de actuar como sustancias antioxidantes. Estos péptidos están inactivos en la secuencia original de la proteína, pero al liberarse por hidrólisis pueden exponer esta propiedad (Zhi et al., 2022). Se ha demostrado que estos péptidos actúan como antioxidantes naturales y tienen el potencial de proteger a la célula del daño oxidativo, puesto que tienen la capacidad para: 1) descomponer el peróxido de hidrógeno, 2) eliminar metales pesados, 3) impedir o disminuir la rapidez de oxidación de los lípidos y 4) reducir la presencia de radicales libres como el peróxido de hidrógeno (Korhonen & Pihlanto, 2006).

Como una tendencia de actualidad debida a los requerimientos de los consumidores de alimentos naturales. La aplicación en la industria alimentaria de antioxidantes sintéticos clásicos como el BHT y el BHA se ha venido restringiendo ante la posibilidad de efectos secundarios nocivos, por su uso en altas dosis (B. Xu et al., 2022). Por lo que, los antioxidantes derivados de fuentes naturales, como el caso de la generación de péptidos bioactivos utilizando proteínas (derivada principalmente de fuentes alimentarias), gozan hoy de gran interés, debido en gran parte a su seguridad y bajo costo potencial.

A nivel fisiológico, un antioxidante (incluyendo un péptido antioxidante), puede ceder sus electrones al radical libre, neutralizando su acción oxidante sin alterar su estabilidad electroquímica. En esta reacción, se genera un radical más estable y la consecuente formación de un radical derivado del péptido (Fig.1.8). Es decir que estos péptidos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, reaccionando con mayor velocidad con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en la membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular.

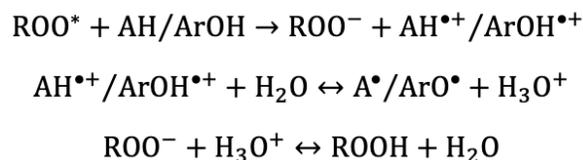


Fig. 1.8. Modo de acción de un antioxidante ante un radical libre cediendo electrones

Además, de la importancia fisiológica de los antioxidantes, estos tienen gran potencial por su efecto en los alimentos mismos. Los péptidos antioxidantes, adicionados en alimentos, pueden por ejemplo retardar o prevenir procesos de oxidación y la formación de productos nocivos derivados

de la interacción entre los componentes de la matriz alimentaria. La utilización de péptidos antioxidantes adicionados en alimentos es considerada por la OMS como una estrategia adecuada en el control de problemas de salud asociados al consumo de alimentos (*WHO: Healthy Diet Fact Sheet No. 394 - Google Académico, 2022*).

En esta función los péptidos antioxidantes pueden bien: atrapar radicales libres (como en el mecanismo explicado Fig.1.8 o formando complejos con los iones metálicos y evitando la oxidación lipídica que conduce a la rancidez y la consecuente disminución de la vida comercial del producto.

1.2.7.2.1 Ensayos químicos para determinación de actividad *in vitro*

En la literatura científica no existe un método que permita determinar la actividad "antioxidante global" de una muestra. Esto debido a que, los mecanismos de acción de estos compuestos atienden a naturalezas diversas, en tanto, cualquier determinación o estimación de la actividad o capacidad dependerá de del mecanismo por el cual estos compuestos pueden retrasar e inhibir la oxidación de sustancias moléculas inestables o iones que tienen electrones desapareados (Gutteridge, 1995). En tanto, es de gran valor establecer métodos con los cuales se pueda medir el nivel de capacidad antioxidante total (TAC) directamente a partir de extractos de alimentos de origen vegetal y biológicos.

Existen muchos métodos con los cuales es posible determinar la actividad antioxidante, ya sea *in vivo* o *in vitro* (ensayos químicos en soluciones homogéneas y métodos complejos que usan sondas externas). Estos últimos son los más usados y aunque pueden ser menos específicos, han demostrado ser valiosos en la una estrategia de búsqueda de nuevas sustancias y en la comprensión de algunos fenómenos asociados a los procesos de obtención de estos compuestos.

Entre los ensayos *in vitro*, es importante realizar una diferenciación entre las denominadas pruebas que punto final, que utilizan el criterio de la desactivación de un agente oxidante específico y los que se basan en la cinética de reacción.

1.2.7.2.1.1 Métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógenos (TAH).

Las técnicas analíticas que se basan en la TAH se centran en estimar la capacidad de un antioxidante (un péptido, por ejemplo) para extinguir los radicales libres (generalmente radicales piróxilos: larga vida media e importancia biológica), en donde el mecanismo principal de reacción es la donación de átomos de H, generando un hidroperóxido y un radical antioxidante más estable químicamente. Este mecanismo se puede resumir en la Fig. 1.9.



Fig. 1.9. mecanismo de reacción por donación de átomos de H⁺ de un antioxidante.

En este caso, las especies AH y ArOH representan: Biomoléculas protegidas y los antioxidantes, respectivamente.

Entre estos métodos, destaca por su versatilidad, uso frecuente en muchas aplicaciones y adaptabilidad a la gran variabilidad de especies radicales, la capacidad de absorción de los radicales de oxígeno (ORAC, del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity)(Ou et al., 2001) . En este ensayo, un radical piróxilo (ROO^\bullet) generado por iniciadores Azoderivados (AAPH), los cuales, por calentamiento, interactúan con una sonda fluorescente (fluorosceína) produciendo una transferencia de hidrogeniones (H^+). El mecanismo se muestra en la Fig. 1.10.

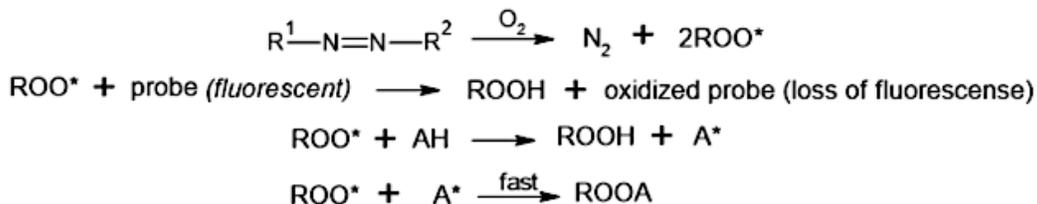


Fig. 1.10 Mecanismo de Técnica ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

Cuando la reacción avanza, la sonda fluorescente se agota y como consecuencia la medida de fluorescencia es menor. El antioxidante adicionado al medio compite con la sonda fluorescente, manteniéndose la fluorescencia (Prior et al., 2005). Los resultados se suelen expresar como equivalentes micromolares de Trolox (ET μmol) por mL o g de sustrato, calculando el área bajo la curva de fluorescencia. A través de esta técnica es posible determinar la capacidad antioxidante de compuestos hidrofílicos y lipofílicos, lo que confiere ventajas en su utilización en matrices alimentarias complejas (Prior et al., 2003).

1.2.7.2.1.2 Métodos basados en la transferencia de electrones (TE).

En estos ensayos, está involucrada una reacción redox, en la cual, el oxidante indica el final de reacción. Como en los otros métodos, para los análisis in vitro, se utiliza un generador sintético de radicales libres y se determina la capacidad de un antioxidante para transferir un electrón y reducir un compuesto. En general son reacciones más lentas que las establecidas en los métodos de TAH. Sin embargo, en estos métodos, la deprotonación de un agente antioxidante es la clave para la expresión relativa de la actividad, en tanto que depende del potencial de ionización. El papel del pH en estas determinaciones se evidencia en el mecanismo clásico general de transferencia expuesto en la Fig. 1.8. De este modo, compuestos de naturaleza fenólica, por ejemplo, tienen grupos -OH débilmente ácidos que se disocian a pH más altos y se hacen más oxidables.

1.2.7.2.1.2.1 Actividad antioxidante por el método FRAP

De acuerdo con Pulido et al. (2000), este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}), que tiene un máximo de absorbancia a una longitud de onda entre 590-595 nm (Pulido et al., 2000). Este método fue propuesto por primera vez por Benzie y Strain para determinar la capacidad antioxidante del plasma y posteriormente adaptado a otras matrices (Apak et al., 2016). En este ensayo el Fe^{+2} producido en la reacción redox puede reaccionar con H_2O_2 para producir OH, que se considera el radical libre más dañino encontrado in vivo.

De otro lado, el reactivo FRAP tiene dificultades para oxidar biotioles lo cual hace que el método sea poco recomendado para evaluar la actividad en fluidos intracelulares y plasma/suero humano (Apak et al., 2016). Los resultados de capacidad antioxidantes determinado por FRAP se correlacionan muy bien, por ejemplo, con los antioxidantes presentes en plantas o frutos (Benzie & Devaki, 2018).

1.2.7.2.1.3 Métodos Mixtos (basados en: TE y TAH).

Los ensayos basados en mecanismos mixtos están fundamentados en la eliminación de un radical cromóforo (como ABTS^{•+} y DPPH[•]), a través de, la acción del antioxidante. Los antioxidantes son buenos agentes reductores, y como se mencionó, pueden ser capaces de inhibir la reducción de agentes como RSO/RNS. Estas pruebas, no siempre utilizan especies reactivas de importancia biológica (como los radicales piróxilos) y con mucha frecuencia se utilizan radicales ajenos al organismo como el DPPH[•] o el ABTS^{•+}, lo cual se ha criticado, argumentando que, estas técnicas son solo capaces de determinar la capacidad de donar electrones y que en muchos casos no se relacionan con la capacidad antioxidante. Pese a esto, un gran número de investigaciones científicas utilizan estos métodos para estimar la capacidad relativa de matrices alimentarias, no alimentarias (Chalamaiah et al., 2012) y en plasma (Seo et al., 2015). Mas recientemente, se ha demostrado que péptidos antioxidantes seleccionados por su elevada capacidad relativa medida por ORAC y ABTS, son capaces proteger a las células del daño oxidativo y que en estos efectos protectores, fueron más fuertes que las del GSH (Zhu et al., 2022). Es claro que pese la argumentación en contra, el uso de estos métodos en la determinación del potencial antioxidante es de especial interés debido a la simplicidad y agilidad de los ensayos.

1.2.7.2.1.3.1 Actividad antioxidante por el método ABTS

La actividad captadora de radicales libres frente al radical ABTS se determinará por medio del método descrito por Re et al. (1999) en el cual se cuantifica la decoloración del radical ABTS^{•+} que se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio. El radical ABTS^{•+}, posee color verde-azul intenso, y en la medición los compuestos con capacidad antioxidante (péptidos, por ejemplo) reaccionan directamente disminuyendo el color del catión radical. Los resultados se indican de acuerdo a la inhibición (proporcional a la disminución de color) y generalmente se expresan en concentración relativa de equivalentes de Trolox (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox -TEAC-)(Re et al., 1999). El mecanismo se muestra en la Fig. 1.11.

1.2.7.3 Péptidos Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE)

Según los datos de la OMS, más de 1000 millones de personas sufren hipertensión arterial en el mundo (Bondre et al., 2020). Esta es una enfermedad crónica caracterizada por el aumento significativo de la presión sanguínea en las arterias y es un factor de riesgo relacionado con enfermedades cardiovasculares, como el infarto al miocardio y arterioesclerosis (Gheibi et al., 2018). Pese a los esfuerzos médicos y organizaciones de salud a nivel mundial, la tasa de prevalencia y de esta enfermedad ha seguido en aumento y con esta la tasa la muerte asociada a su padecimiento (Nishimura et al., 2016).

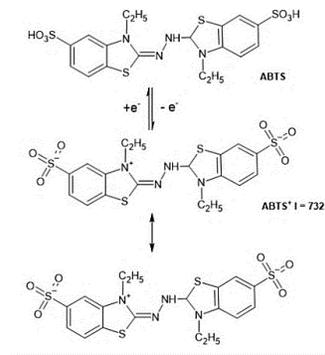


Fig. 1.11. Mecanismo de análisis de actividad antioxidante por método de ABTS*

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), consiste en una serie de reacciones que contribuyen en la regulación de la presión arterial el organismo. La renina, sintetizada en los riñones, es una enzima específica que hidroliza el angiotensinógeno en el plasma sanguíneo, liberando un decapeptido muy inactivo denominado Angiotensina I (Giacchetti et al., 2005). Compuesto sobre el cual actúa la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), liberando por hidrólisis el octapéptido denominado Angiotensina II.

Esta tiene un papel determinante como vasoconstrictor e interviene estimulando la formación de aldosterona en la reabsorción de sodio en el túbulo renal, a través del receptor de la angiotensina II tipo-1. Esto promueve la reabsorción del agua y el consecuente aumento del volumen sanguíneo, con lo que aumenta la presión arterial. (Fig. 1.12). Por esta razón, un enfoque bastante extendido en la literatura científica, para el tratamiento de la hipertensión arterial, con estudios de orden básico y clínico, ha sido el control de la formación de angiotensina II (Soler et al., 2008). En este enfoque, la búsqueda de inhibidores de la ECA ocupa un renglón importante en los esfuerzos científicos a varios niveles por tratar esta enfermedad.

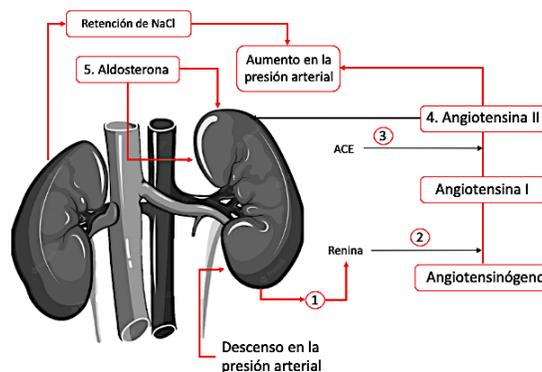


Fig. 1.12. Sistema renina-angiotensina-aldosterona y la presión arterial en humanos

En el tratamiento de la hipertensión a través de, la inhibición de la ECA, se han desarrollado una serie de medicamentos tradicionales, los cuales, pueden causar reacciones adversas (Y. Li et al., 2016). Esto ha generado el interés por compuestos de inhibición de la ECA que sean de alta seguridad y que no tengan efectos secundarios tóxicos (Dong et al., 2022). En recientes investigaciones, se ha desarrollado en el campo de la industria alimentaria el interés por obtener

fracciones peptídicas, inactivas en las secuencias proteicas originales, pero con importantes propiedades inhibitoras de la ACE, cuando se liberan por hidrólisis enzimática de forma específica y controlada.

Péptidos en aplicaciones terapéuticas o farmacéuticas, se producen hoy de diferentes fuentes y con aplicaciones en alimentación para animales y consumo humano, debido a los muchos efectos nutraceuticos reportados por la literatura científica en distintos campos (Abou-Diab et al., 2021). Esta tendencia de consumo está ambientada en el creciente interés de los consumidores, en un mercado de productos ecológicos y la necesidad de hacer más eficientes los procesos industriales.

1.2.8 Usos de la sangre bovina para producir péptidos bioactivos

La sangre bovina, como subproducto importante de la de la industria cárnica, representa una fuente significativa de proteína de bajo costo. Gran parte de la sangre producida en el proceso de faenado bovino se utiliza en la industria alimentaria, principalmente en el diseño de suplementos proteicos, donde se aprovecha su capacidad nutricional y las propiedades emulsificantes y estabilizantes. Pese a esto, mucha sangre se desecha aún como residuo en la industria de la carne (Hyun & Shin, 2000). A pesar de los esfuerzos institucionales a nivel mundial para regular el vertimiento de desechos orgánicos como la sangre bovina y el surgimiento de estrategias tecnológicas que incentivan el uso de estos recursos en líneas de producción rentables. Lo cierto es que, el vertimiento de sangre bovina como residuo, por lo menos en países del tercer mundo, representa un problema ambiental vigente y un desafío pendiente en la industria de producción de carne en el mundo. Esta sangre desechada, impacta negativamente los ecosistemas locales, aldaños a las plantas productoras por su elevado contenido de sólidos y una significativa demanda química de oxígeno (DQO de 500.000 mg O₂/L) (Del Hoyo et al., 2007). Aunque la sangre representa una fuente importante de proteína para nutrición humana y animal, existe cierta resistencia en algunos sectores sociales por el consumo de productos de esta fuente. Las preocupaciones asociadas al miedo de contraer enfermedades como la encefalopatía esponjiforme bovina (BSE) y los efectos alérgicos de algunas de las proteínas como la BSA, son algunos de los argumentos de estos consumidores (Ofori & Hsieh, 2014).

Una alternativa técnicamente viable para el aprovechamiento de la sangre bovina está en el potencial bioactivo de sus hidrolizados proteicos. La hidrólisis enzimática, como tecnología tradicional en la obtención de fragmentos peptídicos de interés bioactivo se ha usado con éxito en el aprovechamiento de sangre bovina. Al respecto, la fracción globular y en especial la hemoglobina, se ha usado ampliamente en la obtención de péptidos opioides (Wei et al., 2020), antibacterianos (Nedjar-Arroume et al., 2008) y más recientemente se ha explorado la capacidad para inhibir la enzima convertidora de la angiotensina, en fracciones peptídicas de hemoglobina de cerdo (Yu et al., 2006) y bovino (Adje et al., 2011). Muchos péptidos bioactivos, son fragmentos cercanos a las regiones N- y C-terminal de las cadenas α y β de la hemoglobina bovina. En especial, muchos péptidos antimicrobianos y antihipertensivos se pueden obtener de la cadena α , entre los fragmentos 67-106 (Adje et al., 2011). Tecnologías alternativas como la electrodiálisis, se ha usado con éxito para probar el efecto de la conductividad eléctrica, sobre el perfil de péptidos bioactivos obtenidos tras la hidrólisis de hemoglobina bovina (Lorenzo et al., 2018).

En la fracción plasmática, por ejemplo, se obtiene por centrifugación cerca 60-70 % del volumen total de sangre. Representada básicamente por albúminas, inmunoglobulinas, α y β -globulinas y fibrinógeno (Duarte et al., 1999). Se ha establecido que, el plasma sanguíneo tiene gran potencial bioactivo, representado básicamente en péptidos antioxidantes y antihipertensivos (Hyun & Shin, 2000a; Salgado et al., 2011). Varias investigaciones se han enfocado en obtención de péptidos bioactivos, a través de la hidrólisis enzimática, usando proteínas presentes en el plasma y proteasas de diferentes características como la papaína (Lafarga et al., 2016), proteasas vegetales y fúngicas (Bah et al., 2016), pepsina y tripsina (Aiemratchanee et al., 2021) y Alcalase (Hou et al., 2019; Liu et al., 2010). Se ha establecido, también que, es posible la liberación tras hidrólisis de un gran número de secuencias con potencial bioactivo. Sin embargo, se ha encontrado que, la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas posee gran complejidad debido principalmente a: i) la naturaleza variada y muchas veces desconocida de los sustratos (estructuras primarias y terciarias de proteínas distintas), ii) la formación de nuevos sustratos de hidrólisis a medida que la reacción avanza, iii) liberación de péptidos cortos y aminoácidos libres que causan inhibiciones serias. iv) inactivación de la enzima en el tiempo (P. Valencia et al., 2015), y v) los efectos asociados a la variada reactividad de los enlaces en relación con la enzima usada, así como la accesibilidad de estas a sitios específicos de reacción (estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas) (Fernández & Riera, 2013).

1.2.9 Las propiedades antioxidantes de los hidrolizados enzimáticos de proteínas (HEP).

Halliwell y Gutteridge, (1998) definieron un antioxidante como toda sustancia que, estando presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Korhonen & Pihlanto, 2006). En el caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos que impiden el normal desarrollo de sus funciones (Korhonen & Pihlanto, 2006). Dentro de la secuencia de las proteínas, algunos péptidos no están activos, pero pueden llegar a estarlo, luego de su liberación por hidrólisis enzimática. En el medio, estos péptidos pueden jugar un papel importante en la neutralización de radicales libres y evitar el daño celular (Sarmadi & Ismail, 2010).

La obtención de fracciones peptídicas con propiedades antioxidantes, está íntimamente relacionada con la naturaleza de la proteína y el tipo de enzima empleada. La actividad de estos péptidos, se asocia con su estructura molecular (Wen et al., 2021). Los péptidos antioxidantes tienen la capacidad de reducir el daño relacionado con el estrés oxidativo del cuerpo a través de la activación de mecanismos de defensa oxidante. La actividad antioxidante de los péptidos está relacionada con su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica y para quelar iones metálicos (Sarmadi & Ismail, 2010). Los antioxidantes sintéticos convencionales (BHA, BHT y n-propilo galato) muestran una fuerte actividad contra varios sistemas oxidantes, pero presentan estricta regulación en su uso por su relación con riesgos potenciales a la salud (Sabeena Farvin et al., 2014) y algunos tienen la desventaja adicional de sus altos costos (Wen et al., 2020). A pesar de que se conocen algunas relaciones entre las estructuras de los péptidos y su capacidad para ejercer actividad antioxidante. No es claro aún cómo estos péptidos neutralizan la acción de los radicales y cual es papel de los aminoácidos de la estructura en este complejo fenómeno (Cui et al., 2022).

Sin embargo, el efecto antioxidante de los péptidos se ha relacionado con la presencia de varios aminoácidos como la tirosina, triptófano, metionina, lisina, histidina y cisteína. Tanto la tirosina (Tyr) por su grupo fenólico -OH, el triptófano (Trp) con su grupo -NH y la cisteína (Cys) con su grupo tiol (SH), pueden donar hidrógenos y/o electrones. Mientras que la metionina (Met) puede ser oxidada hasta Met sulfoxido. Esto significa que, químicamente estos aminoácidos pueden ser efectivos en la eliminación de radicales en técnicas como ABTS y ORAC (Zheng et al., 2016). Otros autores sugieren que no solo la presencia de estos aminoácidos es suficiente para exhibir tal actividad, puesto parece existir una asociación entre, la estructura primaria de los péptidos (López-García et al., 2022; Sousa et al., 2004) y el efecto antioxidante.

La presencia de Gly por ejemplo, interviene en la flexibilidad estructural de la cadena proteica y permite que aminoácidos implicados en efectos actividad se pongan en contacto con los radicales libres (Guru et al., 2021). En forma similar la Pro puede provocar cambios en las estructuras secundarias de las unidades peptídicas, posibilitando la exposición física de grupos funcionales de aminoácidos como la Ser, cuyo grupo hidroxilo puede interactuar directamente con radicales como el DPPH y ABTS (Agrawal et al., 2019) y al que se le ha comprobado su efecto antioxidante y citoprotector *in vitro* sobre lesiones celulares con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Maralani et al., 2012).

La presencia de algunos aminoácidos hidrofóbicos en los residuos peptídicos antioxidantes, tiende a mejorar la accesibilidad de estos en el interior de las matrices celulares hidrófobas (membranas biológicas) (Orsini Delgado et al., 2016). Así, aminoácidos como Leucina (Leu), Valina (Val) y Fenilalanina (Phe) y prolina (Pro), en las estructuras peptídicas, pueden beneficiar la actividad antioxidante a través de una mejora en el acceso de moléculas no polares al seno de las especies reactivas de interés (Rajapakse et al., 2005).

La actividad antioxidante de los péptidos se correlaciona bastante bien con características moleculares asociadas a las propiedades electrónicas, hidrofóbicas, estéricas y de enlaces de hidrógeno de los aminoácidos en las regiones N-terminal y C-terminal. Del mismo modo, se destaca el papel de los aminoácidos voluminosos ubicados en la posición C-terminal de los péptidos y su capacidad para captar radicales libres de distintas características (Y.-W. Li & Li, 2013). Los mecanismos por los cuales estos péptidos ejercen la actividad antioxidante, sigue siendo material de análisis en la variada literatura científica (Wen et al., 2021; Yan et al., 2020), en cuanto existe una gran complejidad química relacionada con los mecanismos por los cuales los péptidos antioxidantes pueden captar radicales libres, quelar iones metálicos y/o inhibir la peroxidación lipídica.

1.2.10 Potencialidades antihipertensivas de HEP

Los péptidos inhibidores del a ACE, cobran cada vez más relevancia en el diseño de fármacos y compuestos relacionados. Esto debido a que muchos de los compuestos de esta naturaleza que vienen siendo utilizados con éxito en tratamiento de la hipertensión arterial (Jimsheena & Gowda, 2010), presentan una serie de efectos adversos, entre las que destacan la tos seca y el angioedema. El desarrollo de alternativas naturales y relativamente seguras para la hipertensión, ha permitido el desarrollo de numerosas opciones científicas, centradas en la obtención, caracterización,

evaluación y síntesis de péptidos antihipertensivos, utilizando proteínas alimentarias (Jimsheena & Gowda, 2010).

Como se mencionó, muchos péptidos, tienen el potencial de inhibir la enzima convertidora de la angiotensina (ACE). Con esta función, intervienen en la regulación de la presión arterial humana. Se han identificado inhibidores competitivos exógenos de esta enzima, a partir de distintas fuentes (pescado, maíz, gelatina, etc) (Hernández-Ledesma et al., 2011). Estos inhibidores compiten con el sustrato por el centro activo de la ACE (Mulero Cánovas et al., 2011). Se ha demostrado que, en este mecanismo de unión, parecen tener relevancia los residuos His383, GLU384, His387, Glu411 de la ACE (Yan et al., 2020). Se ha señalado también, el papel del Zn en la coordinación con los inhibidores (Yan et al., 2020). Factores como el tamaño molecular de los péptidos y por supuesto su secuencia de aminoácidos, juegan un papel importante en la actividad Inhibidora de la ACE, que son capaces de exponer (Hernández-Ledesma et al., 2011). Un factor clave en esta actividad, parece ser la presencia de residuos de aminoácidos hidrofóbicos con gran volumen en la cadena laterales. En el análisis de mecanismos moleculares de interacción de la ACE e inhibidores peptídicos de ACE, se ha puesto en evidencia la relevancia de residuos hidrófobos como el triptófano en la interacción química con el Zinc a través de la coordinación con el oxígeno carboxilo (Yan et al., 2020). Muchos de los péptidos con potencial bioactivo para inhibir la ACE están compuestos de residuos de aminoácidos hidrofóbicos o aromáticos, como prolina, fenilalanina, tirosina y triptófano (Ashok et al., 2019).

Existe hoy, un gran número de investigaciones enfocadas en el la preparación, purificación y secuenciación de estructuras peptídicas inhibidoras de la ACE, utilizado varios sustratos y enzimas, a través de hidrólisis enzimática (Krami & Akbari-adergani, 2019). Esto ha permitido la identificación de numerosas secuencias peptídicas con potencia inhibitoria de distinta magnitud y con diferentes tiempos de duración y de acción. En general se trata de péptidos con tamaños moleculares pequeños (dos o tres residuos), los cuales tienen el potencial de pasar la barrera epitelial en la digestión y llegar a los órganos ejerciendo la actividad especifica en ellos (Jimsheena & Gowda, 2010). Muchos de estos péptidos han demostrado actividad antihipertensiva *in vitro* e *in vivo*

Un enfoque de estudios más recientes ha centrado la intención en la relación estructura actividad de estos péptidos. Este enfoque busca escalear los mecanismos de acción de los péptidos inhibidores y la ACE (Y. Li et al., 2016). Al respecto, el análisis *in silico* a través de herramientas de biología computacional se usa regularmente para predecir la interacción entre la proteína (ACE) y los péptidos obtenidos. Esta técnica ha permitido el desarrollo de una alternativa versátil en el diseño de nuevos inhibidores enzimáticos. Así como explicar el mecanismo químico implícito en el contacto enzima-péptidos y el fenómeno de inhibición.

1.2.11 Mecanismos de acción de los péptidos bioactivos (antioxidantes e Inhibidores de ACE)

El mecanismo exacto con el cual los péptidos ejercen efecto antioxidante no se ha comprendido a cabalidad, hasta la fecha. Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado que algunos péptidos, tienen el potencial químico para eliminar los radicales libres, quelar los iones metálicos (Akbarian et al., 2022), inhibir las reacciones de peroxidación de lípidos y activar el sistema de defensa antioxidante del cuerpo (Fan et al., 2022). Cualquiera de los aminoácidos que conforman

una proteína, tiene la capacidad para interactuar químicamente con los radicales libres, aunque en la práctica, debido a propiedades químicas y físicas únicas de las conformaciones peptídicas, estas demuestran tener mejor capacidad antioxidante frente a radicales comunes. En esta capacidad juegan un papel importante: el contenido de aminoácidos de los péptidos (estructura primaria), el tamaño y la hidrofobicidad (Akbarian et al., 2022).

Estas características de los péptidos resultantes de los procesos de hidrólisis, se pueden ver afectada por las condiciones operativas aplicadas para aislar proteínas, la fuente de proteína, el grado de hidrólisis, el tipo de proteasa, así como también, por las condiciones del proceso de hidrólisis (tiempo, cantidad de enzima/sustrato, pH y Temperatura, entre otras) (Karami & Akbari-adegani, 2019). Por ejemplo, los péptidos con pesos moleculares entre 0,5–1,5 kDa tienen mejores actividades antioxidantes generales que los que están por fuera de estos márgenes peso (X. Li et al., 2008). Mientras que los tripéptidos con triptófano y tirosina en posición C-terminal mostraron una fuerte actividad de eliminación de radicales (Cumby et al., 2008). El efecto antioxidante de las unidades peptídicas que tienen tirosina se puede deber a la transferencia de átomos de hidrógeno, mientras que los que contienen cisteína, triptófano e histidina principalmente se asocia con la transferencia de un solo electrón. Los aminoácidos que contienen residuos aromáticos como la fenilalanina, la histidina y la tirosina podrían transferir protones a radicales deficientes en electrones (Fan et al., 2022).

En cuanto a la actividad inhibidora de la ACE, algunos estudios demuestran que, en forma similar a los antioxidantes, la estructura peptídica y aspectos como la longitud de la cadena son claves en la exposición de esta actividad. Los péptidos inhibidores de la ECA son generalmente péptidos de cadena corta con 2 a 12 aminoácidos (Piovesana et al., 2018). La presencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano o tirosina, prolina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina) y aminoácidos básicos (arginina y lisina) en el C-terminal tienen una fuerte influencia en la unión ACE (Fan et al., 2022). Los péptidos inhibidores de la ACE pueden inducir un cambio conformacional de la ACE, al respecto, la interacción hidrofóbica y eléctrica tienen un impacto evidente en los péptidos (Yan et al., 2020). Se ha encontrado que el átomo de zinc presente en la estructura de ACE es relevante en los mecanismos de combinación enzima-inhibidor, puesto que la coordinación entre el inhibidor y el Zn, “puede afectar el ataque nucleofílico de una molécula de agua activada, lo que lleva a una estructura alterada del sitio activo”(Yan et al., 2020).

Al ser consumidos, estos péptidos, son absorbidos en el intestino delgado durante el proceso de digestión. Como resultado de esto, ingresan al sistema circulatorio para ser transportados a los órganos específicos e iniciar el proceso de regulación fisiológico específico (Di Bernardini et al., 2011b). Ante la falta de información de la forma específica como estos péptidos son digeridos y absorbidos a este nivel, la absorción gastrointestinal simulada utilizando la monocapa de células Caco-2 ofrece el mejor abordaje científico en la actualidad (Karaş et al., 2017).

Algunos de estos fragmentos resisten intactos la hidrólisis a nivel intestinal, pero muchos otros sufren hidrólisis parcial o completa por las enzimas extracelulares del intestino. La clave del éxito de un péptido bioactivo radica en su potencial para llegar intacto al torrente sanguíneo de modo que pueda ejercer los efectos fisiológicos beneficiosos (propiedad bioactiva) (Onuh & Aluko, 2019). Esto representa sin duda una barrera en el desarrollo de tecnologías para la producción de estos compuestos, debido a que no parece ser suficiente identificar un péptido y evaluar su potencial *in vitro*, sino asegurar que una vez ingerido, no sufrirá procesos posteriores de hidrólisis que

disminuyan su potencial. Para esto último, métodos como la modificación química y la microencapsulación, son usados con más frecuencia con la finalidad de proteger la bioactividad de estos compuestos (Karaş et al., 2017).

1.2.12 Análisis *in silico* para caracterización de péptidos

Muchos elementos importantes se deben considerar a la hora de usar péptidos bioactivos adicionados a matrices alimentarias. En este punto, los desarrollos suscitados en las tecnologías de análisis *in silico*, como el cribado *in silico*, la evaluación de la seguridad y la absorción y el transporte simulados *in vivo* son de gran utilidad en el potencial uso de péptidos con fines bioactivos en la industria alimentaria u otras (B. Xu et al., 2022). Como es de esperar por la gran acogida científica y el potencial industrial que tiene el tema de los péptidos bioactivos, existe hoy, un número considerable secuencias peptídicas caracterizadas de la cuales se ha confirmado entre otros efectos beneficiosos para la salud, las actividades antioxidantes y antihipertensivas (Sánchez & Vázquez, 2017). Estas secuencias se han utilizados para el desarrollo de una gran plataforma de apoyo bioinformático con el cual se complementan los estudios *in vitro* e *in vivo*.

Por ejemplo, el análisis *in silico* sería una excelente solución para preseleccionar combinaciones de enzimas antes de los experimentos de química húmeda (Du & Li, 2022). Surgen los simuladores de hidrólisis *in silico*, entre los más usados esta: PeptideCutter. Esta aplicación permite reducir la incertidumbre en los perfiles de péptidos bioactivos en hidrolizados, utilizando la información de la secuencia de la proteína y datos sobre la especificidad de la encima (sitios específicos de escisión). El Departamento de Bioquímica de Alimentos, de la Universidad de Warmia y Mazury en Olsztynes, desarrollaron la una base datos de secuencias de proteínas y péptidos bioactivos - BIOPEP-UWM (Minkiewicz et al., 2019), que se ha convertido en un referente sumamente valioso para el análisis posibles propiedades en secuencias peptídicas obtenidas tras hidrólisis de cualquier fuente. Este sitio tiene más de 50 actividades diferentes y entre las actividades más atractivas, en los estudios científicos realizados en este tema, en años recientes, esta sin duda las propiedades antioxidantes y antihipertensivas (Du & Li, 2022). La información consignada en esta plataforma proviene de determinaciones *in vitro* e *in vivo* y son de gran valor como herramienta de comparación. Los problemas asociados a las determinaciones experimentales como los falsos positivos o subregistro de actividad relacionado con factores interferentes y bajas concentraciones, suelen influir en las determinaciones de propiedades. Aun así, esta estas bases de datos se han extendido en numerosas aplicaciones de análisis *in silico* de péptidos bioactivos. Se han usado con mucho éxito en el análisis de secuencias de péptidos inhibidores de la ACE basados en la concordancia de secuencias conocidas de las bases de datos disponibles. Sin embargo, tienen poca aplicación para predecir la actividad de nuevas secuencias (Gu et al., 2011). Para este fin, recientemente se utilizan los modelos QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) que son una serie de aplicaciones matemáticas y estadísticas que permiten asociar cuantitativamente descriptores de estructura molecular de un compuesto con su actividad. Esta estrategia se ha empleado con éxito en proteínas y péptidos. En estos últimos, se ha utilizado para investigar la actividad antimicrobiana, antihipertensiva y antioxidante (Y.-W. Li & Li, 2013), área en lo cual se consideran enfoques prometedores (Du & Li, 2022). La plataforma AHTpin (<https://webs.iiitd.edu.in/raghava/ahtpin/help.php>), creada como un espacio virtual, basado en aprendizaje automático, en la cual se puede predecir, diseñar y evaluar péptidos antihipertensivos (Kumar et al., 2015). Esta plataforma fundada en modelos QSAR como método para predecir

péptidos antihipertensivos de forma eficiente. Modelos con una precisión media del orden del 79% en la detección de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina. El meta predictor basado en secuencias, mAHTPred (<http://thegleelab.org/mAHTPred>), utiliza también, algoritmos de aprendizaje automático, incluida la máquina de vectores de soporte en el desarrollo de modelo de predicción de péptidos antihipertensivos (Manavalan et al., 2018). Ambas plataformas recientemente se usaron con éxito en la caracterización e identificación de secuencias bioactivas, derivadas de la digestión *in vitro* simulada del Queso chhurpi duro del Himalaya (Abedin et al., 2022).

En la literatura científica, existe un número limitado de aplicaciones enfocadas en la predicción de las actividades antioxidantes de péptidos. Algunos de los estudios más relevantes, están basados en metodologías QSAR utilizando diferentes algoritmos de aprendizaje automático (p. ej., regresión lineal múltiple, máquinas de vectores de soporte y bosque aleatorio) (Olsen et al., 2020). Desafortunadamente, ninguno de estos trabajos ha puesto a disposición una plataforma en línea, similar a las mostradas para actividad antihipertensiva. Al respecto, Olsen et al., (2020), ofrecen la plataforma: AnOxPePred (<http://services.bioinformatics.dtu.dk/service.php?AnOxPePred-1.0>), en la cual, es posible predecir propiedades antioxidantes, como la capacidad para captar radicales libres (FRS) y para quelar metales, de péptidos, usando como información primaria, la secuencia de aminoácidos del mismo, la cual contiene implícitamente datos sobre: tamaño, estructura local y carga. El algoritmo utiliza redes neuronales convolucionales profundas (CNN) y, se entrenó y validó utilizando un conjunto de datos (secuencias peptídicas) de referencia obtenidos de varios artículos y de la base de datos de BIOPEP-UWM.

1.2.12.1 Acoplamiento molecular y análisis de inhibición de la ACE

Es teóricamente posible realizar una aproximación de la interacción entre dos estructuras proteicas y entre estas y pequeñas moléculas llamadas ligandos. Los métodos computacionales de acoplamiento, exploran la conformación del ligando en sitios específicos de unión de una proteína objetivo de estudio, evaluando hasta alcanzar la convergencia a la energía mínima. Este procedimiento utiliza una estrategia de puntuación para clasificar la afinidad del ligando con el sitio activo (Pagadala et al., 2017). Esta estrategia se ha usado con mucho éxito en el desarrollo de fármacos y más recientemente se utiliza con mucha frecuencia en aplicaciones que incluyen el estudio de las bioactividades de péptidos obtenidos tras hidrólisis de proteínas.

Las primeras aplicaciones en este campo se relacionan con la evaluación de modelos de interacción de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y dipeptidil-peptidasa IV (Nongonierma & FitzGerald, 2018), en estudios enfocados en la evaluación de propiedades antihipertensivas de péptidos de fuentes variadas y con distintas enzimas. Recientemente modelos de acoplamiento molecular son usados con relativo éxito en la selección de inhibidores de MPO con actividad antioxidante a partir de hidrolizados proteicos de especies marinas (Y. Zhang et al., 2020) y en esta forma desarrollar estrategias para reducir el estrés oxidativo evitando la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno, implicadas en el mismo. La estrategia de acoplamiento molecular, se ha empleado, además, para explicar la relación estructura-actividad y el mecanismo antioxidante de los péptidos (Wen et al., 2021). Por ejemplo, con péptidos antioxidantes, derivados de la leche, se ha usado acoplamiento para analizar su interacción con Keap1, donde juegan un papel de activación de la vía antioxidante endógena Keap1- Nrf2 (Tonolo et al., 2020). El

acoplamiento molecular, se ha usado de igual forma como complemento en el análisis *in vitro* de la capacidad de péptidos para captar radicales DPPH y ABTS. En este trabajo, péptidos antioxidantes identificados tras hidrólisis enzimática de proteínas de semillas de sandía, se usaron en un análisis de química cuántica y acoplamiento, para estudiar las interacciones de estos oxidantes (DPPH y ABTS) con las unidades peptídicas con actividad *in vitro* declarada (Wen et al., 2021).

1.2.13 Cinética enzimática de proteínas

Las enzimas son sustancias proteicas altamente complejas con tamaños coloidales entre 10 y 100 μm . Se ha reconocido que estas cuentan con propiedades para catalizar reacciones de manera eficiente, debido a su actividad específica. Se sabe que pueden acelerar la velocidad de una reacción en el orden de $10^2 - 10^{11}$. Las enzimas tienen una conformación tridimensional específica que cambia en la catálisis generando tensión en la molécula y volviéndola susceptible a reacción. Este mecanismo es estudiado por la cinética enzimática. La cinética enzimática se encarga del estudio de la velocidad con que se dan las reacciones catalizadas por enzimas (Adler-Nissen, 1986).

En el caso más simple, la reacción de hidrólisis de proteína inicia con una sola molécula proteica. La acción enzimática sobre esta, provoca la ruptura de la cadena y por ende la formación de algunos péptidos intermedios (Fig. 1.13), que son sustratos en las nuevas etapas de la reacción. Esto convierte al sistema en multisustrato. Esta complejidad, dificulta el análisis de la cinética de proteínas desde la perspectiva básica de Michaelis-Menten (M-M). Puesto que, este análisis fue realizado teniendo en cuenta la presencia de un solo sustrato y un solo producto. En tanto, algunos autores sugieren que el uso de estos modelos no es apropiado para el estudio de cinéticas de hidrólisis de proteínas. Sin embargo, la mayoría de estas cinéticas se abordan desde la ecuación de M-M y el uso del GH como descriptor del auge de la reacción, con lo cual, se han logrado muy buenos ajustes en sistemas de elevada complejidad bioquímica (mezclas de proteínas) (P. Valencia et al., 2014b).

1.2.13.1 Efectos de las condiciones de operación en la cinética de hidrólisis de proteínas

1.2.13.1.1 Efectos del sustrato

Los niveles de sustrato tienen un efecto importante sobre la cinética de hidrólisis enzimática de las proteínas y, por lo tanto, sobre los péptidos que se produzcan en ella. En la literatura científica reciente, se han evaluado una gran variedad de niveles de sustrato, con concentraciones iniciales de proteínas que van desde menos de 0,1% hasta 60%. La mayoría de investigaciones realizadas en este campo han usado como referencia, niveles de sustrato experimental (a través de ensayos previos), basados en la información fenomenológica suministrada por análisis general del modelo de Michaelis-Menten (Deng, Butré, et al., 2018). Modelo con el cual, es posible identificar niveles de sustrato inicial (S_0 =variables) donde la velocidad inicial de la reacción, es significativamente relevante, de acuerdo con una concentración de enzima fija (E_0 =constante). Así, se identifica una zona de baja de velocidad cuando el sustrato es poco en relación con la enzima y una de velocidad máxima cuando lo contrario ocurre. Esta lógica permite inferir que, no debería existir ningún efecto importante en el comportamiento de la hidrólisis (en lo referido a velocidad inicial), si se cambia la relación E:S en una relación constante.

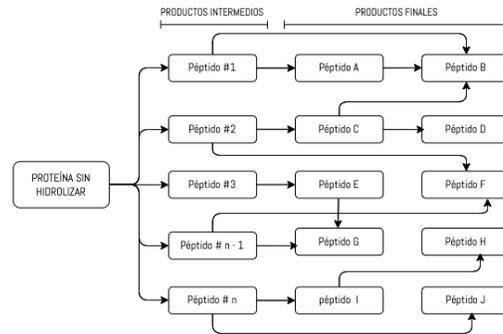


Fig. 1.13. Esquema de ruptura de las cadenas peptídicas dependiente de la especificidad de la proteasa.

De otro lado, se ha demostrado que, existe una influencia de la relación E:S constante, sobre el GH final de reacciones de hidrólisis, utilizando varias enzimas y varios sustratos. Esta diferencia, podría estar relacionada con la velocidad relativa con la cual ocurre la escisión en una posición específica de cadena (llamada selectividad) y se puede asociar, también con: efectos de inhibición derivados de los productos formados, lo cual, produce un cambio en el mecanismo de hidrólisis desde one-by-one a uno de tipo cremallera (Deng, Butré, et al., 2018). Debido a estos distintos mecanismos, los hidrolizados producidos por hidrólisis con diferentes concentraciones de sustrato tenían diferentes perfiles peptídicos (Fernández & Riera, 2013).

Estos mecanismos, tienen gran relevancia al momento de definir aspectos técnicos de operación en sistemas de producción de péptidos bioactivos. Se esperaría, por ejemplo, que aumentando la concentración de sustrato en un reactor y por consiguiente reduciendo la cantidad de agua necesaria para la operación, se reduzca de forma importante la demanda de energía. Sin embargo, esto no es especialmente cierto para algunos sistemas de reacción, puesto que menores GH final, son alcanzados cuando más sustrato hay en el sistema. Lo que puede significar una menor cantidad de péptidos de interés bioactivo (menor tamaño).

A este aspecto se suman los efectos de la accesibilidad de la enzima a los sitios específicos de escisión. En este sentido, se ha analizado el papel de la viscosidad no asociada con sustrato de hidrólisis en la velocidad de reacción (adición de 0,05% (p/v) de goma de algarrobo), lo que según Butré et al., (2014), es de poca relevancia sobre el GH final. Por otro lado, se presume que, la estabilidad estructural de los sustratos y las enzimas, por ser estructuras proteicas, se puede ver afectada por fenómenos de saturación. Esta hipótesis, sin embargo, no fue contundentemente establecida en el caso de β -lactoglobulinas, en la cual se observaron cambios considerados sutiles en la estabilidad estructural para niveles de sustrato en aumento (Verheul et al., 1999).

1.2.13.1.2 El efecto de la enzima

El elemento a clave a tener en cuenta en un proceso de hidrólisis enzimática es el tipo de enzima y su especificidad. Entendida esta, como la capacidad de la proteasa para escindir en las cercanías de un (unos) aminoácido (s) específicos (AA), bien sea del lado carboxilo o amino. En teoría, esto determinaría la composición de péptidos a obtener tras la hidrólisis de una secuencia proteica. Se ha discutido que la eficiencia con la cual estas proteasas rompen enlaces claves en la cadena, no es

total. Esto significa que, algunos otros aspectos, pueden alterar el curso de la reacción (Deng, van der Veer, et al., 2018).

En lo que se refiere a la enzima, un aspecto relevante que se puede considerar es la denominada especificidad secundaria y el papel de la selectividad en esta. La acusada eficacia de catálisis, debida a la especificidad de las reacciones enzimáticas, implica participación de varios grupos funcionales del enzima en el proceso. En teoría, el centro activo de la enzima, está conformado por el centro de fijación y el centro catalítico. Mediante la interacción de los aminoácidos del centro de fijación (interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals) la enzima se une con la porción a fin del sustrato. En este punto, la influencia de los aminoácidos vecinos es determinantes en la hidrólisis, puesto que depende de las interacciones entre el subsitio (S4-S4') de la enzima y el sitio de unión (P4-P4') del sustrato. Donde P4-P4' se refiere a los aminoácidos ubicados desde C-terminal hasta N-terminal del sustrato a hidroliza, siendo P1-P1' el lugar exacto de escisión (Schechter & Berger, 1967). Este modelo, se ha usado con éxito el estudio del impacto de los aminoácidos vecinos (conocida como especificidad secundaria), así como en el análisis de las escisiones perdidas y por supuesto en la definición de las reglas de escisión para varias enzimas.

La catálisis enzimática comprende un proceso de transición complejo, digno de ser comprendido. Para el análisis cinético de las reacciones de hidrólisis de proteínas es importante tener en cuenta:

- a) La Identificación de los aminoácidos relacionados con la fijación del sustrato y en las reacciones de formación y degradación de enlaces.
- b) Determinación de su disposición aproximada en el espacio
- c) Revisión del papel catalítico específico de cada grupo funcional participante

Todo lo cual define la velocidad de reacción con cada sustrato. Una aproximación práctica para el análisis de reacción se obtiene a través de los efectos sobre la saturación (km) y el paso catalítico (kcat).

1.2.13.1.3 Efecto del pH

Las reacciones enzimáticas se ven fuertemente influenciadas por el pH. En principio, la naturaleza proteica de las moléculas enzimáticas se puede alterar por disociación de grupos activos en el centro de fijación y catalítico de la enzima. Esto sin duda, altera las posibilidades de unión y de catálisis. Existe un rango de valores de pH adecuados para la operación de cada enzima. El sustrato, tiene la misma naturaleza química que la enzima, para el caso de las reacciones de hidrólisis de proteínas, lo cual significa que, los iones H^+ OH^- afectan tanto la envoltura acuosa de las mismas, como los grupos ácidos y básicos que conforman las cadenas laterales de los aminoácidos constituyentes.

Esto puede afectar la estructura terciaria, desestabilizando las cargas superficiales, lo que puede resultar positivo, si hay despliegue proteico, ya que permitiría mejor acceso físico al centro catalítico de la enzima. Mientras que, para la hidrólisis puede llegar a ser grave si provoca efectos de desnaturalización que induzcan la precipitación parcial o total de la proteína y la conducente formación una fase sólida. Lo anterior sugiere que el pH de operación de la enzima con un sustrato, no es necesariamente el mejor pH de operación con otro sustrato diferente.

Los cambios en los estados de ionización de una enzima con el pH tienen un comportamiento de campana, debido a la presencia de diferentes grupos con distintos valores de pKa. Si solo una parte de estos son catalíticamente activos, la curva de velocidad inicial V_0 a distintos pHs puede asumir también esta forma. Por otro lado, el sustrato, por ser una proteína, también asume distintos estados de ionización de acuerdo con el pH del medio. Algunos de los cuales no serán aptos para la catálisis, luego, es posible que, a este comportamiento “acampanado”, se superponga una curva de estado de ionización del sustrato que interceptará la curva de la enzima en el punto justo de óptima operación de pH (Punekar, 2018) (Fig. 1.14).

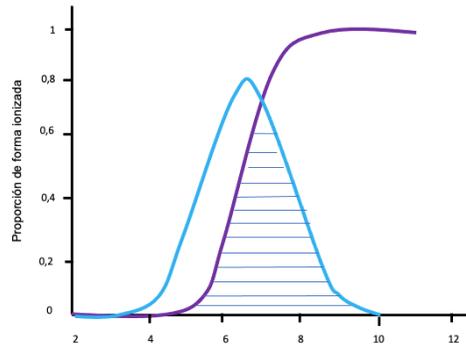


Fig. 1.14. Estados de ionización del sustrato (línea morada) y la enzima (línea azul) en función de los pH del medio. En el eje x se grafica el pH y en el eje y la fracción de grupos ionizados tanto en la enzima como en un sustrato proteico.

De manera experimental existen dos formas para analizar el efecto de variables como el pH utilizando un sustrato nuevo: 1) encontrar la conversión óptima a un determinado tiempo de reacción en diversas condiciones de pH. Se emplea como indicador común el GH, pero puede ser usado cualquier otro descriptor de preferencia para el análisis. 2) estableciendo la velocidad inicial de hidrólisis proteica utilizando gráficos Producto/ Sustrato Vs tiempo. Con este último es posible estimar V_{max} , K_m y K_{cat} aparentes para un rango de niveles de sustrato y una $E_0 =$ constante (Punekar, 2018).

Algunos efectos de desnaturalización en el sustrato o alteración de la capacidad catalítica de la enzima, solo son apreciables experimentalmente con extensos tiempos de exposición a la condición adversa. Esto provoca que una medida en los estadios iniciales de la reacción puede conducir a errores en la apreciación de óptimos de operación. Para que sea apropiada un análisis de la hidrólisis a distintos valores de pH, es pertinente utilizar los valores de V_{max} en vez de datos de estadios iniciales de la reacción (V_0) o información de conversión a un solo sustrato que puede no incluir los efectos de saturación derivados de la presencia de sustrato.

En cualquier caso, ninguna de estas variables permite determinar aspectos como la preferencia de hidrólisis por la proteína intacta y por lo tanto no informa sobre los diferentes tipos de productos obtenidos tras la catálisis. Las condiciones de pH condicionan la especificidad de operación de la enzima y su selectividad, lo que contribuye a que los productos de las reacciones de hidrólisis de proteínas sean proporcional y estructuralmente distintos para cada condición de operación (Butré et al., 2015).

El pH, por lo tanto, es una variable a considerar en los procesos de optimización de producción y se incluye en números ensayo de hidrólisis cuando se operan con nuevos sustratos. Los rangos de operación, sin embargo, dependen mucho más de los efectos del pH sobre la enzima que de otros efectos.

1.2.13.1.4 Efecto de la Temperatura

La velocidad inicial de una reacción enzimática aumenta en aproximadamente el doble de su valor cuando la temperatura de reacción sube unos 10 °C. Es claro que a los aumentos de la temperatura promueven la actividad de la enzima, pero una excesiva exposición térmica y/o nivel de temperatura puede desactivar la función catalítica por desnaturalización o daño térmico. Esta no es más que un catalizador que, en ejercicio de su función, acelera la tasa de catálisis al derribar la barrera de energía de activación. Los catalizadores biológicos atienden a las mismas reglas generales de los catalizadores químicos (Gan et al., 2003; Punekar, 2018). Las enzimas aumentan la velocidad a la que se alcanza el equilibrio, sin afectar el equilibrio (Fig. 1.15).

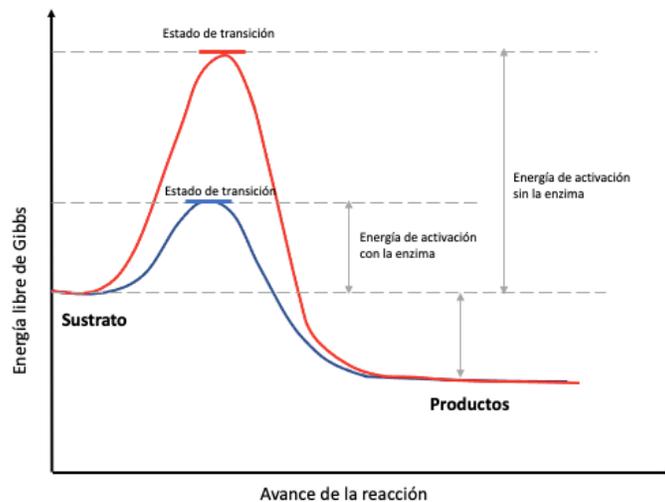


Fig. 1.15. Catálisis enzimática y el papel en la disminución de la barrera de energía (kJ/kmol) de reacciones.

La constante de equilibrio (K_{eq}) y la energía estándar libre de reacción se relacionan de acuerdo con la ecuación (1.13):

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_{eq} \quad (1.23)$$

En la Fig. 1.15 se muestra un esquema para una reacción que va del reactivo (S) al producto (P). El punto más alto a lo largo de la coordenada, para los procesos catalizados (cat) y no catalizados (no-cat) se denomina estado de transición. En este estado de transición representa la barrera energética que se debe superar para que ocurra la reacción. En relación con la energía del estado de los reactivos, cuanto mayor sea la energía del estado de transición más esfuerzo tendrá la reacción para ocurrir y por consiguiente será más lenta. La enzima, le confiere al proceso la capacidad para alcanzar este estado con una menor barrera energética. La magnitud de la reducción de la energía

libre se puede traducir cuantitativamente en el grado de mejora de la tasa de reacción (Copeland, 2000).

La energía requerida para pasar del estado reactivo al estado de transición (teórico) es conocida como energía de activación o barrera de energía de la reacción y como se ve en el esquema de la Fig. 1.15, representa la diferencia entre la energía libre entre estos dos estados. Esta altura, está relacionada con la velocidad de una reacción química a diferentes temperaturas a través de la conocida ecuación de Arrhenius (1.14).

$$k = \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (1.14)$$

En las reacciones de hidrólisis de proteínas, la temperatura también ayuda a extender la estructura plegada del sustrato, lo cual, repercute en un aumento de la velocidad de la reacción y en una mejora de la eficiencia real de hidrólisis, debido a un aumento de la accesibilidad a los sitios específicos de escisión efectivo (Muñoz-Tamayo et al., 2011, 2012b). Pero el aumento de la temperatura acelera la inactivación de la enzima simultáneamente, lo que disminuirá la velocidad de reacción (Shi et al., 2005b). La enzima, tiene un centro activo caracterizado por la presencia de unos aminoácidos específicos que intervienen directamente en la reacción. Pero el resto de la cadena proteica cumple funciones de soporte estructural que permiten al centro catalítico mantener la conformación tridimensional necesaria para una reacción específica y eficaz (Deng, van der Veer, et al., 2018).

1.2.14 Modelos matemáticos en hidrólisis enzimática de proteínas

El esquema de reacción típico de un sistema de reacción enzimático fue sugerido por Henri-Michaelis-Menten (H-M-M) y es ampliamente usado en ingeniería bioquímica para describir la velocidad de reacciones enzimáticas (Copeland, 2000):

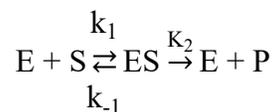


Fig. 1.16. Mecanismo de acción básico de una enzima con u sustrato.

Donde E, S y P representan la concentración de enzima, sustrato y producto, respectivamente. <<ES>> se refiere al complejo enzima sustrato.

Las constantes de velocidad se determinan evaluando la formación de productos o la desaparición de sustrato a medida que la reacción avanza en el tiempo. Un método común para determinar esta velocidad, es estimando la pendiente de la tangente al perfil de velocidad (P Vs tiempo), para distintas concentraciones de S inicial (Fig. 1.17A).

Diferentes perfiles de velocidad se logran en la medida en que la concentración de enzima aumente (Fig.1.17 B). Con una concentración de sustrato suficiente para saturar la enzima en cualquier concentración. La velocidad se duplica con la concentración de enzima. Entre tanto las

concentraciones de productos finales serán idénticas si las de sustrato no varían. Aun así, cuanto menos enzima hay en el sistema, menos producto final hay también en el sistema.

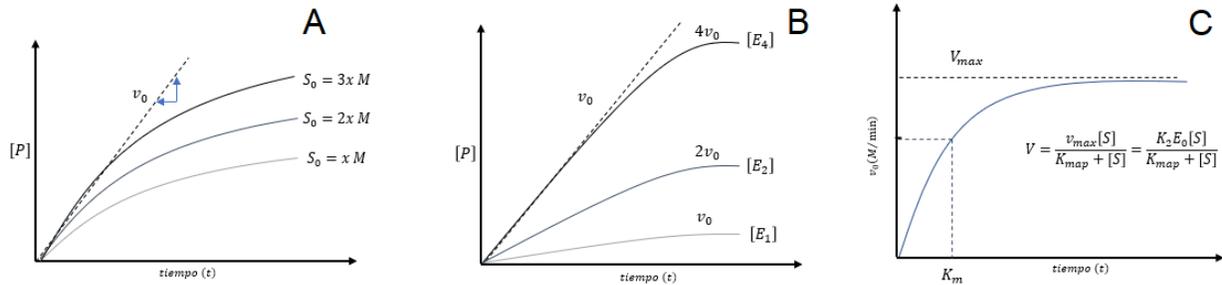


Fig.1.17 A, B y C. Curvas clásicas de velocidad inicial Vs sustrato (A) y enzima (B). Modelo general de Michaelis-Menten (C).

En teoría, cuando la operación ocurre a concentraciones de enzima constante, la velocidad de formación de productos (desaparición de sustrato) alcanza un valor máximo, cuando todos los centros específicos del sustrato están saturados por la enzima (Fig.1.17 C). Los parámetros V_{max} y K_{Mapa} se determinan de la curva de formación de producto <<S Vs V_0 >>.

Los trabajos publicados en el área de la cinética enzimática de proteínas son poco frecuentes y en su mayoría admiten cinéticas simples de un solo sustrato tipo H-M-M, cuya solución es planteada con base en la aproximación de Briggs and Haldane, conocida como la aproximación del estado estable para el complejo intermedio ($dES/dt = 0$). En su forma más simple, esto conlleva a la convencional expresión de velocidad de Michaelis-Menten. En estos casos, la estimación de los parámetros cinéticos se hace generalmente a través del análisis de recíprocos, bien en la forma de Langmuir, Lineweave-burk o Eadie-Hofstee (Punekar, 2018).

Sin embargo, las reacciones de hidrólisis de proteínas son particularmente complejas a nivel molecular, debido al patrón de especificidad de la proteasa y la composición de los sustratos que en ella participan (Margot et al., 1997).

1.2.14.1 Avances en estrategias de modelamiento de hidrólisis de proteínas

La reacción de hidrólisis enzimática de proteínas posee gran complejidad debido principalmente a i) la naturaleza variada y muchas veces desconocida de los sustratos (estructuras primarias y terciarias de proteínas distintas), ii) la formación de nuevos sustratos de hidrólisis a medida que la reacción avanza, iii) la liberación de péptidos cortos y aminoácidos libres que causan inhibiciones enzimáticas, iv) la inactivación de la enzima en el tiempo por efectos térmicos y/o mecánicos, y v) los efectos asociados a la variada reactividad de los enlaces en relación con la enzima usada, así como la accesibilidad de estas a sitios específicos de reacción.

En principio se dio paso a un enfoque factible de análisis, el cual se enfoca en modelamiento de la cinética de proteínas desde una perspectiva puramente empírica. Estos modelos, se basan en ecuaciones cinéticas empíricas y no describen posibles mecanismos de reacción. Son bastante útiles

para el ajuste de datos experimentales, pero no proporcionan información relacionada con la complejidad bioquímica de las reacciones.

Margot et al., (1997), propusieron modelos empíricos en aras de explicar el comportamiento cinético del sistema lactosuero-tripsina. La reacción fue seguida con la fracción de nitrógeno no proteico (NNP), en distintas condiciones: a) bajo condiciones de inactivación moderadas (T menor de 60 °C); b) con bajas velocidades de desactivación e inhibición por sustrato y c) cuando se registran fuertes inactivaciones de la enzima (1. 15-1.17 respectivamente). La ecuación (1.18), representa por su parte, un balance general en el equilibrio de un reactor discontinuo sujeto a inhibición competitiva y no competitiva por productos, así como inhibición por sustrato. Este modelo se basa en la cinética de Michaelis-Menten extendida, por lo tanto, los parámetros cinéticos pueden ser interpretados.

$$\frac{dNNP}{dt} = \frac{a_1 a_2}{(a_2 + t)^2} + a_3 \quad (1.15)$$

$$\frac{dNNP}{dt} = a_1 \frac{e_0}{S_0^2} \exp(-a_2 NPN) \quad (1.16)$$

$$\frac{dNNP}{dt} = a_1 a_2 \exp(-a_2 t) + a_3 a_4 \exp(-a_4 t) \quad (1.17)$$

$$\frac{S_0}{e_0} \frac{dNNP}{dt} = \frac{a_1 S_0 (a_4 - NNP)}{a_2 + S_0 (a_4 - NNP) + 2a_3 S_0^2 (NNP - NNP_0) (a_4 - NNP)} \quad (1.18)$$

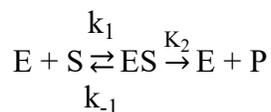
La gran mayoría de estudios asumen que la velocidad de reacción en la proteólisis enzimática sigue una cinética tipo Michaelis-Menten (M-M), con reacciones de primer orden (Barros & Xavier Malcata, 2004; Demirhan et al., 2011; Sousa et al., 2004).

Esto permite conceptualizar sobre los fenómenos globales implícitos en la cinética de polímeros biológicos como las proteínas. Alrededor del análisis de estos fenómenos, englobados en el significado de los parámetros cinéticos, es posible definir condiciones apropiadas de operación de las reacciones de hidrólisis enzimática, así como el tiempo de recambio de enzima, niveles de sustrato y enzima, e incluso tiempos y temperaturas de inactivación de enzimas. Ajustes satisfactorios de estas cinéticas en su forma más simple (sin inhibición), se han realizado empleando suero lácteo y Alcalasa inmovilizada (Sousa et al., 2004), termolisina y caseína en sistemas de recuperación continuo de membrana (A Trusek-Holownia & Noworyta, 2008), entre otras. En aproximaciones más reales se han considerado, también, los fenómenos de inhibición por producto y sustrato (Muñoz-Tamayo et al., 2012b; Qi & He, 2006; Tardioli et al., 2005; P. Valencia et al., 2014a).

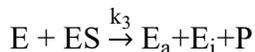
Algunos modelos cinéticos utilizan la cuantificación de proteína remanente, como descriptor de referencia para medir al avance de la reacción. Al respecto, un modelo propuso analizar la concentración de proteínas en el tiempo apoyado en técnicas de cuantificación cromatográficas de separación rápida de proteínas (FPLC), con esta estrategia, Barros & Malcata; (2002-2004) ajustaron modelos tipo M-M con doble sustrato y doble enzima, utilizando suero lácteo. El modelo considera la coexistencia de dos sustratos α -lactoalbúmina y β -lactoglobulinas con una y dos enzimas simultáneamente. En este caso, la determinación de las constantes cinéticas del sistema,

permitió analizar la afinidad de la enzima por los sustratos usados: α -La que por β -Lg. Los parámetros fueron evaluados por análisis de regresión no lineal a través de los datos experimentales, obtenidos de la cinética α -La y β -Lg, cuantificada por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). Esta aproximación resulta satisfactoria, puesto que los parámetros pueden explicar, por ejemplo, preferencias de la enzima por uno u otro sustrato. Sin embargo, tienen una fuerte demanda técnica en los análisis químicos y exige la referencia cuantitativa de la proteína identificada como sustrato. Esto ha motivado que una variable más sencilla de expresar, sea tenida en cuenta para la definición de modelos cinéticos.

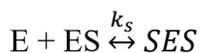
Por su simplicidad, convencionalmente se emplea el GH, como variable de salida en el estudio de modelos cinéticos en hidrólisis de proteínas. Bajo este enfoque, Márquez Moreno y Fernández Cuadrado (1993) y González-Tello et al., (1994), desarrollaron la estructura de un modelo que, además de los efectos de inhibición por sustrato y producto, tiene en cuenta la contribución de los fenómenos de desactivación enzimáticos de forma simultánea, a través del análisis experimental de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas basado en la ecuación de M-M. Así, modelos de la forma general de la ecuación (1.22), pueden ser empleados con éxito en el estudio de reacciones de hidrólisis de proteínas (González-Tello et al., 1994; Marquez Moreno & Fernandez Cuadrado, 1993). Esta ecuación modela el GH como una función del tiempo de reacción (t), con dos parámetros de ajuste (a y b). En este modelo a y b pueden tener diferentes expresiones (en función de la cantidad de enzima y sustrato inicial empleado), dependiendo del mecanismo cinético de reacción propuesto (Qi & He, 2006). Este modelo describe con éxito la forma típica de la hidrólisis de proteínas en el tiempo y se ajusta a los datos experimentales con una alta precisión, combinando bases cinéticas, sencillez y previsibilidad en numerosas aplicaciones (P. Valencia et al., 2011, 2015; P. L. Valencia et al., 2016). En la tabla (1.3) se muestra las diferentes expresiones de los parámetros a y b , en función de la cantidad de sustrato y enzima inicial. La ecuación proviene de la suposición de un mecanismo cinético en el cual, la enzima se liga al sustrato para formar el complejo ES y generar productos, según el siguiente mecanismo:



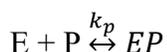
Al mismo tiempo, esta enzima sufre una inactivación que se resume en:



Alternativamente la enzima puede estar unida al complejo ES y generar de forma reversible una inhibición por sustrato, formando un complejo inactivo SES:



Además, parte de producto se puede ligar a la enzima en una inhibición por producto EP:



En este caso E, S y P, representan la concentración de enzima, sustrato y producto, respectivamente. ES; es el complejo enzima sustrato, E_a y E_i indican la concentración de enzima activa e inactiva en la reacción.

Luego, las expresiones de velocidad para la formación de producto (1.19) y para la etapa de desactivación enzimática (1.20) se combinan para obtener una ecuación que relaciona el GH con lo ocurrido con la enzima en el proceso de reacción (1.21)

$$r = s_0 \frac{d(\text{GH})}{dt} = k_2 |\text{ES}| \quad (1.19)$$

$$-\frac{de}{dt} = k_3 |E| |\text{ES}| \quad (1.20)$$

$$s_0 \frac{d(\text{GH})}{de} = \frac{k_2}{k_3 |E|} \quad (1.21)$$

Integrando esta expresión, considerando el balance de enzima en el sistema y la suposición del estado estacionario. Es posible obtener una ecuación de la forma general de la ecuación (1.22).

$$\frac{d(\text{GH})}{dt} = a \exp[-b(\text{GH})] \quad (1.22)$$

Estos enfoques, proporcionan información útil para comprender y modelar la hidrólisis enzimática de proteínas, muy a pesar de que como en el caso específico de las proteínas, una variable de respuesta de esta naturaleza, no permiten esclarecer lo sucedido con los productos formados en el tiempo (péptidos de tamaños y naturaleza química variada). Toda vez que la proteína está formada por unidades monoméricas de naturaleza química distinta (aminoácidos). Cada una de las cuales, se compone de grupos funcionales característicos que le confieren una naturaleza química específica y por tanto una funcionalidad.

Lo cierto es que, estos modelos pueden establecer una relación matemática de la ruptura, aunque no sean tan útiles a la hora de analizar aspectos como el patrón de escisión de la proteína. Esto sugiere que se deben acompañar con rutinas de identificación en aplicaciones donde la necesidad se enfoque en direccionar la hidrólisis hacia la obtención de péptidos de interés específico. En tanto, la comprensión de la formación de péptidos y la dinámica de la hidrólisis es clave para el control de la calidad de los productos finales (Fernández & Riera, 2013).

Cuando los modelos son más robustos, más cerca están de mostrar lo que ocurre realmente en la reacción de hidrólisis de proteínas, al punto de analizar si los péptidos liberados proporcionarán información sobre cómo un enlace peptídico específico está protegido contra la acción de la enzima en función de los aminoácidos vecinos y la accesibilidad física al enlace peptídico (Fernández & Riera, 2013). Fernández y Riera, (2013) monitoreando los péptidos formados en el tiempo en la hidrólisis de β -Lg bovina y tripsina, a través de cuantificación cromatográfica, logran establecer aspectos relacionados con el papel de los aminoácidos vecinos a los sitios de escisión de la enzima, definiendo aspectos relacionados con la especificidad secundaria de la enzima. Estrategias recientes en el modelamiento de estos sistemas se centran en la determinación cualitativa (la longitud de la cadena y la secuencia de aminoácidos) y la composición cuantitativa del hidrolizado

(concentración de productos de hidrólisis, en este caso péptidos de variados tamaños) (Anna Trusek-Holownia & Noworyta, 2015).

Tabla 1.4. Distintas Expresiones de parámetros cinéticos a y b , que aplican para la ecuación exponencial (1.22). De acuerdo con el mecanismo cinético propuesto. Tomado de: Qi & He; (2006).

Mecanismo	a	b
Sin inhibición	$\frac{k_2 e_0}{s_0}$	$\frac{k_3 K_m}{K_2}$
Inhibición por sustrato	$\frac{k_2 K_s e_0}{s_0 K_s + s_0^2}$	$\frac{k_3 K_m K_s}{K_2 (K_s + s_0)}$
Inhibición por producto	$\frac{k_2 e_0 K_p}{s_0 K_s + p K_m}$	$\frac{k_3 K_m K_p s_0}{K_2 (s_0 K_p + p K_m)}$
Inhibición por sustrato y producto	$\frac{k_2 e_0 K_2 K_p}{K_s K_p s_0 + K_p s_0^2 + K_m K_s P}$	$\frac{k_3 K_m K_s K_p s_0}{K_2 (K_s K_p s_0 + K_p s_0^2 + K_m K_s P)}$

Una estrategia de control de la hidrólisis enzimática de β -caseína, basada en el monitoreo de desaparición del sustrato en el tiempo por RP-UPLC, fue propuesta por Muñoz-Tamayo et al., (2011). En sus resultados se evidencia que la velocidad de hidrólisis es más baja cuando la concentración de sustrato es más grande. Situación que puede estar relacionada con mecanismos de accesibilidad relativa de la enzima al sitio activo (en este caso se supone que ocurre por la mezcla de la caseína), tal como anteriormente lo expuso Guadix Escobar, (2011), justificando este fenómeno en la forma globular de la proteína (globulinas de suero lácteo).

Por otra parte, a medida que la reacción avanza en el tiempo, el sustrato se modifica, pues fracciones peptídicas escindidas en las primeras etapas de la reacción y generadas como productos, son a su vez sustratos para las nuevas etapas de la misma. Si el sistema es homogéneo, esto significa que, para cada tiempo de reacción, coexisten en solución una distribución de péptidos de tamaños y naturaleza química variada, parte de los cuales tienen la capacidad para inhibir la acción enzimática, bien uniéndose al centro activo de la enzima o bien al complejo enzima-sustrato. Esto condujo a determinar que, en realidad, las constantes de inhibición por productos, cambian a medida que la reacción transcurre, debido a los cambios en la composición del hidrolizado (P. L. Valencia et al., 2016). Lo que sin duda conduce a pensar que una discriminación más detallada de los productos, bien en términos de tamaño o identificando los péptidos, puede ser una apropiada forma de analizar estos sistemas, aunque en la práctica resulte técnicamente exigente.

Una buena estrategia de modelamiento debe integrar versatilidad y complejidad, puesto que un modelo puede ser muy simple y particularmente útil o demasiado complejo como para ser usado de manera práctica en aplicaciones de optimización, por ejemplo. Un análisis de la distribución aparente de pesos moleculares y su relación con el GH y la relación E/S en los sistemas de reacción puede proporcionar información relevante, tanto para discriminar las condiciones de reacción adecuadas, como para controlar la producción de compuestos peptídicos de interés (Pagán et al., 2013). Sin embargo, determinar el papel que juegan las condiciones de operación (T y la relación

E/S) sobre las fracciones peptídicas formadas en una reacción de hidrólisis, es relevante en cuanto logre, analizar la cinética de formación y los mecanismos implícitos en la misma.

1.2.14.2 Modelos de población

Los modelos de población (MP) se han usado para explicar una amplia gama de situaciones, en donde se representa una población de entidades con una distribución de una o más propiedades. Estas aplicaciones incluyen: procesos de partículas, aerosoles, coloides, polímeros y problemas bioquímicos. La forma más antigua de la ecuación de balance de población (EBP) es una discreta propuesta por Smoluchowski (1917) para explicar coloides (O'Sullivan & Rigopoulos, 2022). Por su versatilidad, estos modelos pueden ser usados como herramientas en el análisis matemático de procesos en los cuales se estima la evolución dinámica de la distribución del tamaño de partículas (PSD) en función de las condiciones de operación (Ramkrishna, 2000).

En un sentido estricto, en los balances de población, establecen una descripción de la distribución de dichas partículas. En este, se hace seguimiento a una entidad como representación de una característica digna de estudio. Estas entidades pueden ser, partículas sólidas, gotas, burbujas, células o, cualquier evento del sistema en estudio. Las entidades pueden distinguirse entre sí por una serie de variables que pueden ser continuas o discretas. <<Las variables que distinguen a una entidad pueden consistir en coordenadas "externas" que se refieren a su ubicación física y coordenadas "internas" que se refieren a características internas de la entidad, como tamaño, temperatura, composición, etc>>(Ramkrishna & Mahoney, 2002). La Fig. 1.18, muestra un esquema que representa una descripción de un balance de población.

La ecuación de balance de población general para un sistema por lotes, suponiendo que no hay variación en las coordenadas externas y el tamaño de las partículas como la única coordenada interna se muestra en la ecuación (1.23) (Falola et al., 2013):

$$\frac{\partial f(m;t)}{\partial t} + \underbrace{\frac{\partial}{\partial m} [G(m)f(m;t)]}_{\text{growth rate}} - B(m;t) + D(m;t) = 0 \quad (1.23)$$

En donde $f(m;t)$ se refiere a la densidad de partículas, $G(m)$ es la tasa de crecimiento, $B(m;t) + D(m;t)$ son términos de nacimiento y muerte respectivamente. Estos mecanismos pueden ocurrir por tres fenómenos: Nucleación, agregación y ruptura.

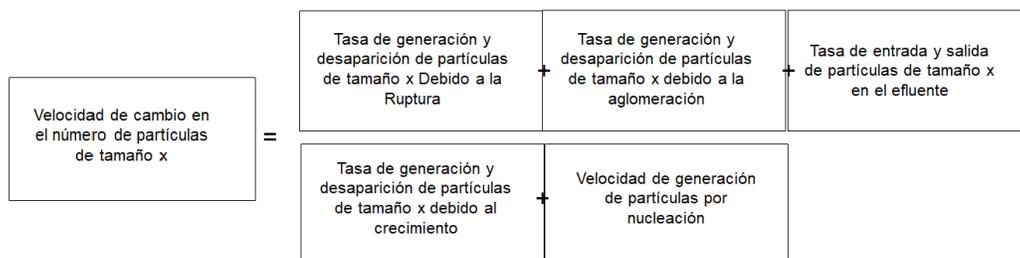


Fig. 1.18. Descripción general de la ecuación de balance de población (EBP).

Es posible la solución analítica de EBP para algunos casos particulares. Es muy común utilizar métodos numéricos para la solución de la mayoría de problemas en esta aplicación. Estos métodos numéricos se pueden clasificar en términos generales en dos categorías principales: la clase de los métodos que resuelven directamente la densidad numérica (p. ej., el método de los mínimos cuadrados y los métodos de balance de población discreta) y los métodos que resuelven para los momentos de la densidad numérica. Estos últimos, implican conversión de la EBP a ecuaciones en términos de los momentos de la densidad numérica. Se usan con frecuencia debido a la ventaja descrita en el costo computacional comparado con los métodos de balance de población discreta.

1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo General

Analizar los mecanismos cinéticos asociados a la hidrólisis enzimática de proteínas de plasma bovino y su relación con la actividad biológica de los hidrolizados obtenidos.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Analizar la influencia de la concentración de enzima y de sustrato en el comportamiento cinético de reacciones de hidrólisis enzimática de proteínas de plasma bovino.

1.3.2.2 Determinar la actividad biológica (Antioxidante y Antihipertensiva) de fracciones peptídicas provenientes de la hidrólisis enzimática de proteínas plasma bovino con Alcalasa 2,4 L.

1.3.2.3 Evaluar modelos matemáticos para el ajuste de datos experimentales, relacionando la actividad biológica con el tamaño de los péptidos, el tipo y secuencia de aminoácidos de las fracciones peptídicas provenientes de las reacciones de hidrólisis enzimática de proteínas de sangre bovina

1.3.2.4. Identificar estrategias de análisis *in silico* con potencial para el análisis complementario en el estudio de péptidos antioxidantes y antihipertensivos obtenidos de la hidrólisis de sangre bovina con Alcalasa.

REFERENCIAS

- Abedin, M. M., Chourasia, R., Chiring Phukon, L., Singh, S. P., & Kumar Rai, A. (2022). Characterization of ACE inhibitory and antioxidant peptides in yak and cow milk hard chhurpi cheese of the Sikkim Himalayan region. *Food Chemistry: X*, *13*, 100231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100231>
- Abou-Diab, M., Thibodeau, J., Fliss, I., Dhulster, P., Nedjar, N., & Bazinet, L. (2021). Impact of conductivity on the performances of electro-acidification and enzymatic hydrolysis phases of bovine hemoglobin by electrodialysis with bipolar membranes for the production of bioactive peptides. *Separation and Purification Technology*, *269*, 118650. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2021.118650>
- Adje, E. Y., Balti, R., Kouach, M., Guillochon, D., & Nedjar-Arroume, N. (2011). α 67-106 of bovine hemoglobin: a new family of antimicrobial and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *European Food Research and Technology*, *232*(4), 637–646. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1430-z>
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. (1st ed.). Elsevier applied science publishers. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19870419770>
- Agrawal, H., Joshi, R., & Gupta, M. (2019). Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate. *Food Research International*, *120*, 697–707. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.11.028>
- Ahangari, H., Yazdani, P., Ebrahimi, V., Soofiyan, S. R., Azargun, R., Tarhriz, V., & Eyvazi, S. (2021). An Updated review on production of food derived bioactive peptides; focus on the psychrotrophic bacterial proteases. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *35*, 102051. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102051>
- Aiemratchanee, P., Panyawechemontri, K., Phaophu, P., Reamtong, O., & Panbangred, W. (2021). In vitro antihypertensive activity of bioactive peptides derived from porcine blood corpuscle and plasma proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, *56*(5), 2315–2324. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14853>
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbalpour, S., & Uversky, V. N. (2022). Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant {Activity}/{Capacity} {Measurement}. 1. {Classification}, {Physicochemical} {Principles}, {Mechanisms}, and {Electron} {Transfer} ({ET})-{Based} {Assays}. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(5), 997–1027. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>
- Ashok, A., Brijesha, N., & Aparna, H. S. (2019). Discovery, synthesis, and in vitro evaluation of a novel bioactive peptide for ACE and DPP-IV inhibitory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *180*, 99–110. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.07.009>
- Bah, C. S. F., Carne, A., McConnell, M. A., Mros, S., & Bekhit, A. E.-D. A. (2016). Production of bioactive peptide

- hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. *Food Chemistry*, 202, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.020>
- Barros, R. M., & Malcata, F. X. (2002). Modeling the {Kinetics} of {Whey} {Protein} {Hydrolysis} {Brought} about by {Enzymes} from {Cynara} cardunculus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4347–4356. <https://doi.org/10.1021/jf0200319>
- Barros, R. M., & Xavier Malcata, F. (2004). A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin {A} extracted from {Cynara} cardunculus. *Food Chemistry*, 88(3), 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.046>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008a). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–236. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0325-29572008000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008b). *Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones*. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53542208>
- Benzie, I. F. F., & Devaki, M. (2018). The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. In *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity* (pp. 77–106). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119135388.ch5>
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2020). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139–150. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
- Bondre, S. V., Chavan, R. S., Raut, I. D., Mohite, S. K., & Magdum, C. S. (2020). An overview of survey on antihypertensive drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(3), 160–162. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85115029074&partnerID=40&md5=25a26e36a2bf01ba738b2ffb9068a924>
- Bourseau, P., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Massé, A., Guérard, F., Chabeaud, A., Fouchereau-Péron, M., Le Gal, Y., Ravallec-Plé, R., Bergé, J.-P., Picot, L., Piot, J.-M., Batista, I., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., & Johansson, I. (2009). Fractionation of fish protein hydrolysates by ultrafiltration and nanofiltration: impact on peptidic populations. *Desalination*, 244(1), 303–320. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.05.026>
- Butré, C. I., Sforza, S., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2015). Determination of the influence of the pH of hydrolysis on enzyme selectivity of *Bacillus licheniformis* protease towards whey protein isolate. *International Dairy Journal*, 44, 44–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.12.007>
- Butré, C. I., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2014). Influence of water availability on the enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 49(11), 1903–1912. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.08.009>
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4),

- 3020–3038. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.06.100>
- Chew, L. Y., Toh, G. T., & Ismail, A. (2019). *Chapter 15 - Application of Proteases for the Production of Bioactive Peptides* (M. B. T.-E. in F. B. Kuddus (ed.); pp. 247–261). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00015-3>
- Copeland, R. A. (2000). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. John Wiley & Sons.
- Cui, L., Yang, G., Lu, S., Zeng, X., He, J., Guo, Y., Pan, D., & Wu, Z. (2022). Antioxidant peptides derived from hydrolyzed milk proteins by *Lactobacillus* strains: A BIOPEP-UWM database-based analysis. *Food Research International*, *156*, 111339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111339>
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *109*(1), 144–148. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.12.039>
- de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, *74*, 185–198. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.05.013>
- Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. *Meat Science*, *76*(3), 402–410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.06.014>
- Demirhan, E., Apar, D. K., & Ozbek, B. (2011). Effect of temperature and {pH} on kinetics of sesame cake hydrolysis. *Current Opinion in Biotechnology*, *22*, *Supple*, S81. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.05.243>
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, *86*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.06.018>
- Deng, Y., van der Veer, F., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2018). Towards predicting protein hydrolysis by bovine trypsin. *Process Biochemistry*, *65*, 81–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.006>
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011a). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, *124*(4), 1296–1307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011b). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, *124*(4), 1296–1307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>
- Dong, J., Wang, S., Yin, X., Fang, M., Gong, Z., & Wu, Y. (2022). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antihypertensive effects of rice peptides. *Food Science and Human Wellness*, *11*(6), 1539–1543. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.06.011>
- Du, Z., & Li, Y. (2022). Review and perspective on bioactive peptides: A roadmap for research, development, and

- future opportunities. *Journal of Agriculture and Food Research*, 9, 100353. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100353>
- Duarte, R. T., Carvalho Simões, M. C., & Sgarbieri, V. C. (1999). Bovine Blood Components: Fractionation, Composition, and Nutritive Value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 231–236. <https://doi.org/10.1021/jf9806255>
- Falola, A., Borissova, A., & Wang, X. Z. (2013). Extended method of moment for general population balance models including size dependent growth rate, aggregation and breakage kernels. *Computers & Chemical Engineering*, 56, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2013.04.017>
- Fan, H., Liu, H., Zhang, Y., Zhang, S., Liu, T., & Wang, D. (2022). Review on plant-derived bioactive peptides: biological activities, mechanism of action and utilizations in food development. *Journal of Future Foods*, 2(2), 143–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2022.03.003>
- Felix, M., Cermeño, M., & FitzGerald, R. J. (2020). Influence of Hydrolysis on the Bioactive Properties and Stability of Chickpea-Protein-Based O/W Emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(37), 10118–10127. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02427>
- Fernández, A., & Riera, F. (2013). β -Lactoglobulin tryptic digestion: A model approach for peptide release. *Biochemical Engineering Journal*, 70, 88–96. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.10.001>
- Fernández, A., Suárez, A., Zhu, Y., FitzGerald, R. J., & Riera, F. A. (2013). Membrane fractionation of a β -lactoglobulin tryptic digest: {Effect} of the {pH}. *Journal of Food Engineering*, 114(1), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.030>
- Figuerola, O. A., Zapata, J. É., & Gutiérrez, G. A. (2012). MODELING OF THE KINETICS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BOVINE PLASMA PROTEINSS. *Revista EIA*, 17, 71–84. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-12372012000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Gan, Q., Allen, S. J., & Taylor, G. (2003). Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*, 38(7), 1003–1018. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00220-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00220-0)
- Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., Yang, M., Yuan, L., McClements, D. J., & Sun, Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 687–699. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>
- García Arteaga, V., Apéstegui Guardia, M., Muranyi, I., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2020). Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 65, 102449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102449>

- Gheibi, S., Jeddi, S., Kashfi, K., & Ghasemi, A. (2018). Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H₂S: Implications in hypertension. *Biochemical Pharmacology*, *149*, 42–59. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.017>
- Giacchetti, G., Sechi, L. A., Rilli, S., & Carey, R. M. (2005). The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *16*(3), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.02.003>
- González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P., & Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: {I}. {Kinetic} models. *Biotechnology and Bioengineering*, *44*(4), 523–528. <https://doi.org/10.1002/bit.260440415>
- Gu, Y., Majumder, K., & Wu, J. (2011). {QSAR}-aided in silico approach in evaluation of food proteins as precursors of {ACE} inhibitory peptides. *Food Research International*, *44*(8), 2465–2474. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.051>
- Guadix Escobar, A. M. (2011). *Producción en reactores de membrana de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/15653>
- Guru, A., Lite, C., Freddy, A. J., Issac, P. K., Pasupuleti, M., Saraswathi, N. T., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Arshad, A., & Arockiaraj, J. (2021). Intracellular ROS scavenging and antioxidant regulation of WL15 from cysteine and glycine-rich protein 2 demonstrated in zebrafish in vivo model. *Developmental & Comparative Immunology*, *114*, 103863. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dci.2020.103863>
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, *41*(12 Pt 2), 1819–1828.
- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, *165*(1), 23–35. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2010.11.001>
- Hou, C., Wu, L., Wang, Z., Sagner, E., & Zhang, D. (2019). Purification and Identification of Antioxidant Alcalase-Derived Peptides from Sheep Plasma Proteins. *Antioxidants*, *8*(12), 592. <https://doi.org/10.3390/antiox8120592>
- Hyun, C.-K., & Shin, H.-K. (2000a). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin {I} converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, *36*(1–2), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00176-X)
- Hyun, C.-K., & Shin, H.-K. (2000b). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, *36*(1–2), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00176-X)
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Wu, J. (2014). Effects of skipjack roe protein hydrolysate on properties and oxidative stability of fish emulsion sausage. *LWT - Food Science and Technology*, *58*(1), 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.02.036>

- Je, J.-Y., Qian, Z.-J., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42(5), 840–846. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.02.006>
- Jimsheena, V. K., & Gowda, L. R. (2010). Arachin derived peptides as selective angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitors: Structure–activity relationship. *Peptides*, 31(6), 1165–1176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.02.022>
- Jr, T. P. (1995). *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press.
- Karami, Z., & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
- Karás, M., Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Złotek, U., & Zielińska, E. (2017). Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(2), 291–305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ijfs.13323>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945–960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Kuddus, M. (2019). *Chapter 1 - Introduction to Food Enzymes* (M. B. T.-E. in F. B. Kuddus (ed.); pp. 1–18). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00001-3>
- Kumar, R., Chaudhary, K., Singh Chauhan, J., Nagpal, G., Kumar, R., Sharma, M., & Raghava, G. P. S. (2015). An in silico platform for predicting, screening and designing of antihypertensive peptides. *Scientific Reports*, 5(1), 12512. <https://doi.org/10.1038/srep12512>
- Lafarga, T., Aluko, R. E., Rai, D. K., O'Connor, P., & Hayes, M. (2016). Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 81, 91–99. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.01.007>
- Li-Chan, E. C. Y. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science*, 1, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>
- Li, P., Xu, F., Zhou, H., Gao, Y., Zhu, H., Nie, W., Wang, Z., Wang, Y., Deng, J., Zhou, K., & Xu, B. (2022). Evolution of antioxidant peptides and their proteomic homology during processing of Jinhua ham. *LWT*, 166, 113771. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113771>
- Li, Q., Yi, L., Marek, P., & Iverson, B. L. (2013). Commercial proteases: present and future. *FEBS Letters*, 587(8), 1155–1163. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>
- Li, X., Han, L., & Chen, L. (2008). In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9), 1660–1666. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.3264>

- Li, Y.-W., & Li, B. (2013). Characterization of structure–antioxidant activity relationship of peptides in free radical systems using {QSAR} models: {Key} sequence positions and their amino acid properties. *Journal of Theoretical Biology*, *318*, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.10.029>
- Li, Y., Zhou, J., Zeng, X., & Yu, J. (2016). A Novel ACE Inhibitory Peptide Ala-His-Leu-Leu Lowering Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Medicinal Food*, *19*(2), 181–186. <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.3483>
- Linden, G., & Lorient, D. (1996). *Bioquímica Agroindustrial: Revalorización Alimentaria de la Producción Agrícola*. Acribia, Editorial, S.A.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, *118*(2), 403–410. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.05.013>
- López-García, G., Dublan-García, O., Arizmendi-Cotero, D., & Gómez Oliván, L. M. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Peptides Derived from Food Proteins. *Molecules*, *27*(4). <https://doi.org/10.3390/molecules27041343>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Gómez, B., Barba, F. J., Mora, L., Pérez-Santaescolástica, C., & Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides as natural antioxidants in food products – A review. *Trends in Food Science & Technology*, *79*, 136–147. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2018.07.003>
- Ly, R., Dong, Y., Bao, Z., Zhang, S., Lin, S., & Sun, N. (2022). Advances in the activity evaluation and cellular regulation pathways of food-derived antioxidant peptides. *Trends in Food Science & Technology*, *122*, 171–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.026>
- Manavalan, B., Basith, S., Shin, T. H., Wei, L., & Lee, G. (2018). mAHTPred: a sequence-based meta-predictor for improving the prediction of anti-hypertensive peptides using effective feature representation. *Bioinformatics*, *35*(16), 2757–2765. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1047>
- Maralani, M. N., Movahedian, A., & Javanmard, S. H. (2012). Antioxidant and cytoprotective effects of L-Serine on human endothelial cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*, *7*(4), 209–215.
- Margot, A., Flaschel, E., & Renken, A. (1997). Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, *32*(3), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00060-X)
- Márquez, M. C., & Vázquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, *35*(1–2), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00041-2)
- Marquez Moreno, M. C., & Fernandez Cuadrado, V. (1993). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, *28*(7), 481–490. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(93\)85032-B](https://doi.org/10.1016/0032-9592(93)85032-B)
- Martínez-Medina, G. A., Barragán, A. P., Ruiz, H. A., Ilyina, A., Martínez Hernández, J. L., Rodríguez-Jasso, R. M., Hoyos-Concha, J. L., & Aguilar-González, C. N. (2019). *Chapter 14 - Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry* (M. B. T.-E. in F. B. Kuddus (ed.); pp. 221–246). Academic Press.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00014-1>
- Mat, D. J. L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, *239*, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.115>
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez-Cachá Martínez, A., Leal Hernández, M., & Abellán Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación En Arteriosclerosis*, *23*(5), 219–227. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arteri.2011.04.004>
- Muñoz-Tamayo, R., de Groot, J., Bakx, E., Wierenga, P. A., Gruppen, H., Zwietering, M. H., & Sijtsma, L. (2011). Hydrolysis of β -casein by the cell-envelope-located {PI}-type protease of {Lactococcus} lactis: {A} modelling approach. *International Dairy Journal*, *21*(10), 755–762. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.03.012>
- Muñoz-Tamayo, R., de Groot, J., Wierenga, P. A., Gruppen, H., Zwietering, M. H., & Sijtsma, L. (2012a). Modeling peptide formation during the hydrolysis of β -casein by {Lactococcus} lactis. *Process Biochemistry*, *47*(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.012>
- Muñoz-Tamayo, R., de Groot, J., Wierenga, P. A., Gruppen, H., Zwietering, M. H., & Sijtsma, L. (2012b). Modeling peptide formation during the hydrolysis of β -casein by {Lactococcus} lactis. *Process Biochemistry*, *47*(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.012>
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E. Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., & Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, *29*(6), 969–977. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2008.01.011>
- Nishimura, M., Yoshida, S.-I., Haramoto, M., Mizuno, H., Fukuda, T., Kagami-Katsuyama, H., Tanaka, A., Ohkawara, T., Sato, Y., & Nishihira, J. (2016). Effects of white rice containing enriched gamma-aminobutyric acid on blood pressure. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, *6*(1), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.022>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2018). Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(15), 3407 – 3423. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0793-9>
- O’Sullivan, D., & Rigopoulos, S. (2022). A conservative finite volume method for the population balance equation with aggregation, fragmentation, nucleation and growth. *Chemical Engineering Science*, *263*, 117925. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2022.117925>
- Ofori, J. A., & Hsieh, Y.-H. P. (2014). Issues Related to the Use of Blood in Food and Animal Feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(5), 687–697. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.605229>
- Olsen, T. H., Yesiltas, B., Marin, F. I., Pertseva, M., García-Moreno, P. J., Gregersen, S., Overgaard, M. T., Jacobsen,

- C., Lund, O., Hansen, E. B., & Marcatili, P. (2020). AnOxPePred: using deep learning for the prediction of antioxidative properties of peptides. *Scientific Reports*, *10*(1), 21471. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78319-w>
- Onuh, J. O., & Aluko, R. E. (2019). Metabolomics as a tool to study the mechanism of action of bioactive protein hydrolysates and peptides: A review of current literature. *Trends in Food Science & Technology*, *91*, 625–633. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.002>
- Orsini Delgado, M. C., Nardo, A., Pavlovic, M., Rogniaux, H., Añón, M. C., & Tironi, V. A. (2016). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained by gastrointestinal digestion of amaranth proteins. *Food Chemistry*, *197*, 1160–1167. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.11.092>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & L. Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, *9*(2), 91–102. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>
- Pagán, J., Ibarz, A., Falguera, V., & Benítez, R. (2013). Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones. *Journal of Food Engineering*, *119*(3), 655–659. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.040>
- Pant, G., Prakash, A., Pavani, J. V. P., Bera, S., Deviram, G. V. N. S., Kumar, A., Panchpuri, M., & Prasuna, R. G. (2015). Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Taibah University for Science*, *9*(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jtusc.2014.04.010>
- Petrillo, T., O'Donohoe, C. A., Howe, N., & Malthouse, J. P. G. (2012). Importance of Tetrahedral Intermediate Formation in the Catalytic Mechanism of the Serine Proteases Chymotrypsin and Subtilisin. *Biochemistry*, *51*(31), 6164–6170. <https://doi.org/10.1021/bi300688k>
- Petrova, I., Tolstorebrov, I., & Eikevik, T. M. (2018). Production of fish protein hydrolysates step by step: technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing. *International Aquatic Research*, *10*, 223–241.
- Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guérard, F., Chabeaud, A., Legal, Y., Alvarez, O. M., Bergé, J.-P., Piot, J.-M., Batista, I., Pires, C., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I., & Bourseau, P. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(11), 1819–1826. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4020>
- Piovesana, S., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., La Barbera, G., Montone, C. M., Zenezini Chiozzi, R., & Laganà, A. (2018). c identification and validation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(15), 3425 – 3444. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0852-x>

- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC(FL))) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3273–3279. <https://doi.org/10.1021/jf0262256>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Punekar, N. S. (2018). *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Springer.
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.02.005>
- Ramkrishna, D. (2000). *Population Balances: Theory and Applications to Particulate Systems in Engineering*. Elsevier.
- Ramkrishna, D., & Mahoney, A. W. (2002). Population balance modeling. Promise for the future. *Chemical Engineering Science*, 57(4), 595–606. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(01\)00386-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-2509(01)00386-4)
- Ramli, A. N. M., Hong, P. K., Abdul Manas, N. H., & Wan Azelee, N. I. (2022). Chapter 25 - An overview of enzyme technology used in food industry (M. Kuddus & C. N. B. T.-V.-A. in F. P. and P. T. E. T. Aguilar (eds.); pp. 333–345). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89929-1.00011-1>
- Rani, S., Pooja, K., & Pal, G. K. (2018). Exploration of rice protein hydrolysates and peptides with special reference to antioxidant potential: Computational derived approaches for bio-activity determination. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 61–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.013>
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalya, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technology and Biotechnology*, 56(1), 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–

1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Rutherford, S. M. (2010). Rutherford, S. M. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in *Journal of AOAC INTERNATIONAL* Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(5), 1515–1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>
- Sabeena Farvin, K. H., Andersen, L. L., Nielsen, H. H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., & Jessen, F. (2014). Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, 149, 326–334. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.03.075>
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M.-P., & Amar, R. Ben. (2014a). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: {Impact} on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, 65, Part C, 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.026>
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. P., & Amar, R. Ben. (2014b). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, 65(PC), 453–461. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.04.026>
- Saidi, S., Deratani, A., Ben Amar, R., & Belleville, M.-P. (2013). Fractionation of a tuna dark muscle hydrolysate by a two-step membrane process. *Separation and Purification Technology*, 108, 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.01.048>
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433–1440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.003>
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2010.06.020>
- Schechter, I., & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27(2), 157–162. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80055-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80055-X)
- Schlimme, E., & Buchheim, W. (2002). *La Leche y Sus Componentes: Propiedades Químicas y Físicas*. Acribia, Editorial, S.A.
- Seo, H.-W., Jung, E.-Y., Go, G., Kim, G.-D., Joo, S.-T., & Yang, H.-S. (2015). Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 185, 106–111.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.133>
- Shi, D., He, Z., & Qi, W. (2005a). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, *40*(5), 1943–1949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>
- Shi, D., He, Z., & Qi, W. (2005b). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, *40*(5), 1943–1949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>
- Sierra-Lopera, L. M., & Zapata-Montoya, J. E. (2021). Optimization of enzymatic hydrolysis of red tilapia scales (*Oreochromis* sp.) to obtain bioactive peptides. *Biotechnology Reports*, *30*, e00611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00611>
- Singh, P., & Kumar, S. (2019). *Chapter 2 - Microbial Enzyme in Food Biotechnology* (M. B. T.-E. in F. B. Kuddus (ed.); pp. 19–28). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00002-5>
- Singh, S., & Bajaj, B. K. (2017). Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. *Energy, Ecology and Environment*, *2*(6), 370–386. <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0076-5>
- Soler, M. J., Lloveras, J., & Batlle, D. (2008). Angiotensin converting enzyme 2 and its emerging role in the regulation of the renin angiotensin system. *Medicina clinica*, *131*(6), 230–236. <https://doi.org/10.1157/13124619>
- Sousa, J., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F., & Giordano, R. C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *21*(2), 147–153.
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 2143–2196. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.060>
- Tao, H., & Cornish, V. W. (2002). Milestones in directed enzyme evolution. *Current Opinion in Chemical Biology*, *6*(6), 858–864. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(02\)00396-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1367-5931(02)00396-4)
- Tapal, A., & Tikku, P. K. (2019). *Chapter 27 - Nutritional and Nutraceutical Improvement by Enzymatic Modification of Food Proteins* (M. B. T.-E. in F. B. Kuddus (ed.); pp. 471–481). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00027-X>
- Tardioli, P. W., Sousa Jr., R., Giordano, R. C., & Giordano, R. L. C. (2005). Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by {Alcalase}@ immobilized on 10% glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*(4), 555–564. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.002>
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *90*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Tonolo, F., Folda, A., Cesaro, L., Scalcon, V., Marin, O., Ferro, S., Bindoli, A., & Rigobello, M. P. (2020). Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, *64*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103696>

- Trusek-Holownia, A., & Noworyta, A. (2008). Peptides removing in enzymatic membrane bioreactor. *Desalination*, 221(1–3), 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.115>
- Trusek-Holownia, Anna, Lech, M., & Noworyta, A. (2016). Protein enzymatic hydrolysis integrated with ultrafiltration: Thermolysin application in obtaining peptides. *Chemical Engineering Journal*, 305, 61–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.087>
- Trusek-Holownia, Anna, & Noworyta, A. (2015). A model of kinetics of the enzymatic hydrolysis of biopolymers – a concept for determination of hydrolysate composition. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 89, 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2015.01.008>
- Valencia, P., Cornejo, I., Almonacid, S., Teixeira, A. A., & Simpson, R. (2011). Kinetic {Parameter} {Determination} for {Enzyme} {Hydrolysis} of {Fish} {Protein} {Residue} {Using} {D}-optimal {Design}. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 290–296. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0628-1>
- Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., & Almonacid, S. (2015). Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 50(4), 589–597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028>
- Valencia, P. L., Flores, S. A., Pinto, M. J., & Almonacid, S. F. (2016). Analysis of the operational strategies for the enzymatic hydrolysis of food proteins in batch reactor. *Journal of Food Engineering*, 176, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.029>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014a). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014b). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. G. (1999). Association behavior of native β -lactoglobulin. *Biopolymers*, 49(1), 11–20. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199901\)49:1<11::AID-BIP2>3.0.CO;2-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199901)49:1<11::AID-BIP2>3.0.CO;2-1)
- Vreeke, G. J. C., Lubbers, W., Vincken, J.-P., & Wierenga, P. A. (2022). A method to identify and quantify the complete peptide composition in protein hydrolysates. *Analytica Chimica Acta*, 1201, 339616. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339616>
- Wei, F., Zhao, L., & Jing, Y. (2020). Hemoglobin-derived peptides and mood regulation. *Peptides*, 127, 170268. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2020.170268>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 308–322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2021). Study on the structure–activity relationship of watermelon seed antioxidant peptides by using molecular simulations. *Food Chemistry*, 364, 130432.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130432>

- WHO: *Healthy diet fact sheet no. 394* - Google Académico. (2022). [https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Healthy diet&publication_year=2020&author=WHO](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Healthy+diet&publication_year=2020&author=WHO)
- Wubshet, S. G., Lindberg, D., Veiseth-Kent, E., Kristoffersen, K. A., Böcker, U., Washburn, K. E., & Afseth, N. K. (2019). *Chapter 8 - Bioanalytical Aspects in Enzymatic Protein Hydrolysis of By-Products* (C. M. B. T.-P. S. S. Galanakis Processing and Applications (Ed.); pp. 225–258). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816695-6.00008-8>
- Xu, B., Wang, X., Zheng, Y., Li, Y., Guo, M., & Yan, Z. (2022). Novel antioxidant peptides identified in millet bran glutelin-2 hydrolysates: Purification, in silico characterization and security prediction, and stability profiles under different food processing conditions. *LWT*, *164*, 113634. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113634>
- Xu, H., Yao, N., Xu, H., Wang, T., Li, G., & Li, Z. (2013). Characterization of the Interaction between Eupatorin and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Molecular Modeling Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(7), 14185–14203. <https://doi.org/10.3390/ijms140714185>
- Yan, W., Lin, G., Zhang, R., Liang, Z., Wu, L., & Wu, W. (2020). Studies on molecular mechanism between ACE and inhibitory peptides in different bioactivities by 3D-QSAR and MD simulations. *Journal of Molecular Liquids*, *304*, 112702. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2020.112702>
- Yin, S.-W., Tang, C.-H., Cao, J.-S., Hu, E.-K., Wen, Q.-B., & Yang, X.-Q. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* {L}.) protein isolate. *Food Chemistry*, *106*(3), 1004–1013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.030>
- Yu, Y., Hu, J., Miyaguchi, Y., Bai, X., Du, Y., & Lin, B. (2006). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin. *Peptides*, *27*(11), 2950–2956. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.05.025>
- Zhang, J., Chen, Q., Zhou, Y., Zhang, Y., Ren, Y., & Liu, L. (2022). Characterization and determination of bovine immunoglobulin G subtypes in milk and dairy products by UPLC-MS. *Food Chemistry*, *390*, 133170. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133170>
- Zhang, Y., He, S., Bonneil, É., & Simpson, B. K. (2020). Generation of antioxidative peptides from Atlantic sea cucumber using alcalase versus trypsin: In vitro activity, de novo sequencing, and in silico docking for in vivo function prediction. *Food Chemistry*, *306*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125581>
- Zheng, L., Zhao, Y., Dong, H., Su, G., & Zhao, M. (2016). Structure–activity relationship of antioxidant dipeptides: Dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues. *Journal of Functional Foods*, *21*, 485–496. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.003>
- Zhi, T., Li, X., Sadiq, F. A., Mao, K., Gao, J., Mi, S., Liu, X., Deng, W., Chitrakar, B., & Sang, Y. (2022). Novel antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (*Argopecten irradians*) mantle using enzymatic and

microbial methods: Preparation, purification, identification and characterization. *LWT*, *164*, 113636. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113636>.

Zhu, L., Xiong, H., Huang, X., Guyonnet, V., Ma, M., Chen, X., Zheng, Y., Wang, L., & Hu, G. (2022). Identification and molecular mechanisms of novel antioxidant peptides from two sources of eggshell membrane hydrolysates showing cytoprotection against oxidative stress: A combined in silico and in vitro study. *Food Research International*, *157*, 111266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111266>.

CAPÍTULO 2. OPTIMIZACIÓN DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA FRACCIÓN GLOBULAR DE SANGRE BOVINA Y EFECTO DE LA DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL SIMULADA SOBRE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

RESUMEN

En este trabajo se optimizó la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas de la fracción globular de sangre bovina usando la metodología de superficie de respuesta (MSR), se evaluó el efecto de la concentración de sustrato (S_0 : 8-12 %), la relación enzima/sustrato (E_0/S_0 : 4-12 g/100 g proteína) y el pH (8-10), sobre el grado de hidrólisis (GH), en un reactor Batch (temperatura de 55° C, por 2 h). La optimización del modelo estadístico entregó un máximo GH de 38,08 % para pH: 8,16; S_0 : 6,6 y E_0/S_0 : 14,7, el cual fue corroborado experimentalmente dando un GH de $36,25 \pm 0,3$ con sesgo negativo de 5 %. A estas condiciones se tomaron muestras a tres tiempos de hidrólisis para evaluar la capacidad antioxidante, con los métodos ORAC, ABTS y FRAP, alcanzando mayor capacidad antioxidante el mayor tiempo de hidrólisis, después de una digestión *in vitro* se corroboró que la capacidad antioxidante del hidrolizado se conserva.

Palabras clave: péptidos bioactivos, hidrólisis enzimática, actividad antioxidante, sangre bovina, proteína.

2.1. INTRODUCCIÓN

Desde el momento que se empieza la acumulación de materia prima de origen biológico para el acondicionamiento y la transformación en productos de consumo por parte de la agroindustria, hasta las últimas etapas de los diferentes procesos se generan diversos subproductos que al no ser aprovechados se convierten en un problema para las empresas procesadoras. En el caso de la industria cárnica se generan subproductos como sangre, tendones, astillas de huesos y diferentes recortes, que realmente no tienen una demanda clara en el mercado. La sangre proveniente de sacrificio animal representa una parte significativa de estos subproductos, alrededor de 4 % de peso vivo del animal (Bah et al., 2013).

La sangre es una fuente rica en proteínas de alta calidad, pero muy poco valorada en el mercado, por tal razón, diferentes investigaciones han estudiado los hidrolizados de sangre de diferentes animales de consumo, con el fin de evaluar la capacidad biológica de los péptidos resultantes de sus fracciones (Bah et al., 2013). En la última década se ha establecido que algunos péptidos obtenidos por hidrólisis de proteínas alimentarias, son capaces de ejercer efectos biológicos específicos, tales como: antimicrobiano, antiviral, anticancerígeno, opioide, antioxidante, antihipertensivo y antitrombótico (Karami & Akbari-adergani, 2019; Sánchez & Vázquez, 2017; Sarmadi & Ismail, 2010), mientras que, en el caso de la sangre se ha podido evaluar principalmente su capacidad antioxidante y antihipertensiva (Hyun & Shin, 2000; Salgado et al., 2011). Estas actividades dependen especialmente de factores como el tipo de proteasa utilizada, las condiciones de la hidrólisis, la composición en amino-ácidos, la secuencia y configuración de los péptidos (Tavano, 2013). Obtener hidrolizados con altos grados de hidrólisis (GH), es de interés cuando de buscar péptidos bioactivos se trata, debido a la relación entre la actividad biológica de los péptidos y su peso molecular, siendo las fracciones con pesos moleculares entre 1- 4kDa los más interesantes para usos nutricionales y/o farmacéuticos.

Buscando comprender el proceso de hidrólisis enzimática de proteínas se han planteado diferentes modelos para representar la cinética enzimática de proteínas de fuentes alimentarias, como caseínas, lactoalbumina, hemoglobina bovina y sustratos de origen vegetal, generando información básica para la optimización de procesos (Figuroa et al., 2012). Además, se han estudiado los modelos y mecanismos enzimáticos considerando la inhibición de enzimas y relacionándolo con las constantes cinéticas, obteniendo buenos ajustes para las curvas de cinéticas (Qi & He, 2006; Rubio et al., 1993; Valencia et al., 2014, 2015). Mientras que otros estudios han demostrado que el pH y la concentración de sustratos son claves en análisis de la hidrólisis enzimática de proteínas de sangre porcina y bovina.

Los péptidos bioactivos de diferentes fuentes han encontrado aplicación en la industria nutraceútica y farmacéutica, principalmente para la elaboración de alimentos funcionales. En esta investigación se buscó la optimización del proceso de hidrólisis de la fracción globular de la sangre bovina (FG) con respecto al grado de hidrólisis GH, analizando la cinética enzimática con relación a las variables más importantes del proceso (pH, S_0 y E_0/S_0). Los hidrolizados resultantes de la optimización fueron evaluados en sus propiedades antioxidantes con métodos *in vitro*, luego se sometieron a un proceso de digestión *in vitro* y se analizó su efecto sobre la capacidad antioxidante.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se detalla la preparación de las muestras, los materiales y métodos usados, además del diseño de experimentos utilizado.

2.2.1. Preparación de hidrolizados enzimáticos

Se emplearon reactores de vidrio de 500 mL conectados a un regulador termostático. El control de pH se hizo empleando un titulador automático Titrand 842 (Metrohm, Suiza), operado por ordenador (software Tiamo 1.2.1). El medio de reacción fue constantemente agitado utilizando agitadores magnéticos (200 rpm). La sangre fue suministrada por Altecsan, una empresa dedicada a la comercialización de sangre higienizada, ubicada en la ciudad de Medellín-Colombia. Al momento de recepción del sustrato se realizaron controles microbiológicos de mohos y levaduras, coliformes totales y mesófilos. Las muestras de sangre bovina se centrifugaron a 4° C en una centrifuga Boeco (Ref. 1406-12) a 8500 rpm durante 10 min para separar la fracción globular (FG) del plasma, se realizó doble centrifugación para obtener la mayor recuperación de FG. Posteriormente la FG fue almacenada a -20 °C hasta el momento de la hidrólisis. El análisis del contenido proteico se llevó a cabo por el método de determinación del nitrógeno total Kjeldahl. La enzima usada fue Alcalase 2,4 L grado alimenticio (Novozymes, Dinamarca), cuyo componente principal es Subtilisina A (Subtilisina Carlsberg). La concentración de enzima y el pH en cada ensayo se fijaron para cumplir con las relaciones enzima/sustrato (E_0/S_0) que se definieron en el diseño experimental. De igual forma que el pH, el cual se ajustó adicionando NaOH 1N (preparado con NaOH 97% pureza Merck). Mientras que la temperatura y el tiempo de hidrólisis se fijaron en 55° C y 2 h respectivamente

La reacción fue monitoreada para la determinación del grado de hidrólisis (GH), expresado como la relación entre el número de enlaces peptídicos cortados en la hidrólisis (h) y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa por unidad de peso (h_t). Para este caso, se empleó un h_t de 8,3 Eqv/Kg (Márquez & Vázquez, 1999). El método empleado para la determinación del grado de hidrólisis es el de valoración del protón o método del pH-estático Ecuaciones (2.1-2.3) (Adler-Nissen, 1986).

$$GH = \frac{BN_B}{M_p} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_t} \quad (2.1)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (2.2)$$

$$pk = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} 2400 \quad (2.3)$$

Donde B es el Volumen consumido de base en litros, N_B = Normalidad de la base (Eqv/L), M_p es Masa de la proteína en Kg y α es el grado de disociación de los grupos $\alpha-NH_2$ liberados en la reacción, el cual depende del pK, que a su vez está asociado con la temperatura (Valencia *et al.*, 2014).

Los valores del GH en el tiempo de reacción, obtenidos en cada corrida experimental se ajustaron al modelo exponencial propuesto por Márquez-Moreno y Fernández-Cuadrado (Márquez-Moreno y Fernández-Cuadrado, 1993; Qi y He, 2006) que permite analizar el comportamiento del GH en el tiempo con dos constantes cinéticas “a” y “b”, como se indica en la Ecuación (2.4). Las constantes cinéticas se calcularon con los resultados de GH y tiempo, medidos cada cinco minutos hasta 2 horas, por el método de mínimos cuadrados utilizando la función “Isqcurvefit” del “toolbox” de Matlab 2014 R2014a. La bondad de ajuste del modelo se evaluó utilizando el coeficiente de determinación.

$$GH = \frac{1}{b} \ln(abt + 1) \quad (2.4)$$

2.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante

Para la medición de la capacidad antioxidante se emplearon los métodos de determinación directa ABTS e indirecta ORAC y FRAP. Para el ajuste de las técnicas se usó un espectrofotómetro marca Thermo Scientific Genesis 10 S UV-vis. Para los tres métodos se establecieron curvas de calibración con diferentes concentraciones del antioxidante estándar Trolox (análogo hidrofílico del alfa tocoferol, Lote STBB72184, ALDRICH). Los resultados se expresan como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de proteína ($\mu\text{molET/g}$ proteína). Todos los reactivos usados para la medición de capacidades antioxidantes fueron de grado analítico.

2.2.3. Método FRAP (capacidad de reducción férrica)

Mide el efecto que tienen los compuestos antioxidantes para reducir en un medio ácido el hierro férrico (Fe^{+3}) hasta la forma ferrosa (Fe^{+2}). Se siguió la metodología ajustada de Pulido *et al.*, en la que 900 μL del reactivo FRAP (con TPTZ, FeCl_3 y buffer de acetato de sodio 3 M, S7899 SIGMA) recién preparado y calentado a 37° C, se mezclan con 90 μL de agua destilada y 30 μL de la muestra o estándar Trolox y se incuban a 37° C por 30 min; la absorbancia se lee a 595 nm (Pulido *et al.*, 2000).

2.2.4. Método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) o ABTS

Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS^+ (ácido 2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico) provocado por la interacción con moléculas donantes de electrones. Se basó en la metodología descrita por Re *et al.*, en el cual 100 μL de la muestra o estándar Trolox, son mezclados con 1 mL de la solución ABTS^+ e incubados a 30° C por 30 min. Después de esto se toman las medidas de absorbancia a 730 nm (Re *et al.*, 1999).

2.2.5. Método ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

Mide el efecto estabilizador de los radicales libres que tienen los compuestos antioxidantes mediante un mecanismo de donación de un átomo de hidrógeno. La capacidad antioxidante del método Orac se determinó por la metodología descrita por Ou *et al.*, en la mezcla de 150 μL de fluorescina 1 μM (sustrato fluorescente) y 25 μL de muestra (diluidos en buffer fosfato 10 μM a pH 7,4 hasta una concentración de proteínas de 0,2 mg/mL), fueron preincubada por 30 min a 37°

C. Luego 25 μL de una solución de 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) 250 mM fue adicionada. La intensidad de la fluorescencia fue medida con longitudes de onda de excitación y emisiones fijadas en 485 y 520 nm, respectivamente (Ou et al., 2001).

2.2.6. Digestión *in vitro*

Tanto a la FG entera como a la hidrolizada se les realizó un ensayo de digestión *in vitro*, siguiendo la descripción de Gómez *et al.*, 2013, que fue ajustada de la metodología de Yagoub *et al.*, 2004, en la cual la muestra de interés fue incubada con 10 μg de pepsina/mg proteína (E.C. 3.4.23.1; $\geq 250 \text{ U mg}^{-1}$ sólido; Sigma, Louis, USA), a un pH de 2 ajustado con HCl, durante 3 h a 37° C, se ajustó el pH de la mezcla entre 7,5 a 8,0 con adición de NaOH (0,2 N), luego la adición del buffer fosfato (pH 7.4) con 1 mM de CaCl, 0,01 % de NaN₃ y 13 μg de pancreatina/mg de proteína (Sigma, No. P1750). Finalmente, la mezcla se incubó a 37° C durante 24 horas (Gómez et al., 2013). Los hidrolizados se inactivaron y almacenaron a -20° C para la determinación de la capacidad antioxidante.

2.2.7. Diseño experimental

Se analizó la influencia de los factores pH, concentración inicial de sustrato (S_0 m/V) y relación enzima/sustrato (E_0/S_0 m/m), sobre las variables respuesta, las cuales fueron el GH y las constantes cinéticas a y b de la (ec-2.4). Para ello, se ejecutó un diseño de experimentos Central Compuesto Rotable, con los niveles de los factores que se indican en la Tabla 1. El análisis de varianza (ANOVA) y los ajustes de los modelos (ec-2.5), se hicieron utilizando el software *Statgraphics Centurion XVI*. La calidad de ajuste se verificó por medio del R^2 y el R^2 Ajustado. La significancia de los coeficientes estimados en los modelos se probó con el estadístico F a un nivel de confianza de 95 % (valor $p < 0,05$). Una vez obtenido el modelo, se empleó la metodología de superficie de respuesta MSR para establecer las condiciones óptimas de trabajo recomendadas para maximizar el rendimiento de la hidrólisis (maximizar el GH). Los datos codificados y sin codificar para este diseño se muestran en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Variables independientes y sus niveles codificados y reales utilizados en el diseño MSR

Variable		Niveles codificados			
		-1,68	-1	0	+1
pH	7,32	8	9	10	10,68
S_0 (% m/v)	6,63	8	10	12	13,36
E_0/S_0 (% m/m)	1,27	4	8	12	14,73

$$Y_j = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (2.5)$$

Donde Y_j es la respuesta predicha (GH), X_i y X_j desde $i, j = 1$ hasta 3 son las variables independientes o factores; β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} , son los términos independientes, lineales, cuadráticos y de interacción del polinomio.

En el caso de los resultados de análisis de capacidad antioxidante por los métodos FRAP, ABTS y ORAC se hicieron por triplicado y se realizó un análisis de diferencias significativas entre medias con el test de rangos múltiples de Duncan. La significancia de las comparaciones entre medias de la capacidad antioxidantes se probó con el estadístico F y un nivel de confianza del 95 % ($P < 0,05$).

2.2.8. Optimización por MSR

Una de las herramientas generalmente empleadas para establecer condiciones óptimas de operación es la metodología de superficie de respuesta, la cual se basa en el método de la máxima pendiente en ascenso, que consiste en recorrer la trayectoria de máxima pendiente, que conduce a la dirección del máximo cambio en la respuesta. La región de exploración son los niveles codificados de los factores evaluados. En este estudio se empleó el software *Statgraphics Centurion*, para corroborar los resultados de la rutina de optimización. Los valores óptimos de los factores (pH, S_0 y E_0/S_0), se emplearon en la ejecución de tres replicas experimentales, cuyos resultados se compararon con los predichos por el modelo polinomial ajustado. En estos ensayos se tomaron muestras a diferentes tiempos de hidrólisis para someterlas al proceso de digestión *in vitro* y posteriormente determinarles las capacidades antioxidantes (FRAP y ABTS) antes y después de la digestión.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se describen los resultados en subsecciones para una mejor organización de los resultados presentados con su discusión.

2.3.1. Determinación de las constantes de la Ecuación de Hidrólisis enzimática de la FG de sangre bovina

Los valores del GH para la hidrólisis enzimática de la FG y las constantes “a” y “b” estimadas por regresión no lineal de la Ecuación (2.4), así como los coeficientes de determinación (R^2), se muestran en la Tabla 2.2 En la cual se evidenció la relación entre las variables independientes codificadas y el rendimiento de la reacción (GH) para las 19 corridas definidas por el diseño experimental.

Se obtuvo un buen ajuste de las constantes cinéticas “a” y “b” para la mayoría de las reacciones de hidrólisis experimentales del diseño ($R^2 > 0,95$). Esta calidad del ajuste de la Ecuación (2.4) ha sido reportada por diferentes autores para otros sustratos (Demirhan et al., 2011; Valencia et al., 2015).

2.3.2. Efectos de los factores sobre las respuestas

En la Tabla 2.2 se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la prueba de significancia de los coeficientes del modelo. El análisis indica que E_0/S_0 es el factor más significativo sobre el GH, puesto que los términos lineales y cuadráticos muestran un efecto muy significativo elevado con valores $p \leq 0,01$ y $p \leq 0,05$ respectivamente.

Tabla 2.2 Diseño central compuesto para la hidrólisis enzimática de la fracción globular de sangre bovina. Valores de GH, a y b, obtenidos de la curva de hidrólisis a 2 horas de reacción.

# corrida	pH	S ₀	E ₀ /S ₀	GH	a	B	R ²
	Variables codificadas						
1	-1	1	1	27,0752	6,7784	0,1718	0,957
2	0	0	0	30,5763	14,8029	0,1835	0,9682
3	0	-1,68	0	29,0578	15,1328	0,1897	0,9533
4	0	-1	-1	23,1937	2,3383	0,1546	0,9178
5	1	-1	-1	19,1689	4,6055	0,2494	0,9926
6	1	1	-1	27,8498	1,7835	0,1104	0,9555
7	-1	-1	1	31,7236	9,0767	0,1528	0,9579
8	0	1,68	0	31,0637	5,5459	0,1376	0,9358
9	1	1	1	26,0182	5,0398	0,1736	0,9678
10	1,68	0	0	22,5548	32,7888	0,2942	0,9547
11	0	0	0	31,2958	8,2872	0,1531	0,9636
12	0	0	1,68	34,2958	17,8838	0,1572	0,9555
13	-1,68	0	0	22,7574	2,0376	0,1496	0,9708
14	0	0	0	31,0476	11,4581	0,1698	0,9836
15	0	0	0	30,3410	8,1447	0,1605	0,9866
16	1	-1	1	25,3664	43,4013	0,2667	0,9587
17	0	0	-1,68	21,5955	1,433	0,1492	0,9991
18	-1	1	-1	22,6949	3,1362	0,1841	0,9979
19	0	0	0	28,1226	7,0187	0,1714	0,9925

En la región de exploración los efectos lineales de S₀ y el pH no resultan significativos, sin embargo, las interacciones de estos factores si lo son ($p \leq 0,05$) y a juzgar por el considerable valor del coeficiente en el modelo, estas dos variables juegan un papel importante en la predicción del GH. Teniendo en cuenta que el pH tiene un efecto cuadrático elevado con $p \leq 0,01$, es concluyente que este factor presenta un efecto dual sobre la respuesta (GH) en la región de exploración, indicando que aunque la enzima utilizada es de amplio rango de trabajo a pH alcalino con este sustrato (hemoglobina bovina), lo más recomendable es operar a valores de pH cercanos a 8,0. La actividad de la enzima se ve fuertemente afectada por el pH, debido a que el estado activo de la enzima se presenta en alguna forma ionizada de la misma, lo cual está influenciado por los cambios de pH y la disociación de los grupos activos, propiciando mayor afinidad por el sustrato (Shi et al., 2005). Este fenómeno explica, entre otras cosas, la significancia estadística de la interacción pH*S₀ del análisis mostrado (Tabla 2.3). Los resultados muestran, además, que la disminución del rendimiento de la reacción a valores de pH elevados, puede deberse a fenómenos de desnaturalización de la enzima a esos valores de pH.

El análisis de los efectos de las variables independientes sobre las constantes cinéticas “a” y “b” del sistema de reacción Alcalasa-FG de sangre bovina, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Valencia P, *et al*, la cual analiza las constantes cinéticas como función de las condiciones de operación de la reacción (Valencia *et al.*, 2015). Los parámetros cinéticos estimados por el ajuste de la Ecuación (4) empleando datos experimentales se muestran en la Tabla 2.2 Los resultados son coherentes con el argumento y la expresión de los mecanismos desarrollados expuesto por Qi *et al.*, 2006, quienes al deducir las posibles expresiones de los parámetros en la

Ecuación (4) de acuerdo con el mecanismo cinético asumido, indican que, a pesar de los posibles mecanismos expuestos, el parámetro “a” siempre depende de la concentración de enzima (E_0) y el parámetro “b” de la constante cinética (K_m) (Qi y He, 2006). Los resultados muestran que los valores de “a” efectivamente aumentan con la E_0/S_0 , cuando la temperatura y pH permanecen constantes, lo cual es consistente con los resultados de varios autores (Figuroa *et al.*, 2012; Valencia *et al.*, 2015; Camacho *et al.*, 1993).

Tabla 2.3. Significancia para los coeficientes de regresión del modelo ajustado.

Fuente	GH		“a”		“b”	
	Coefficiente	Valor-P	Coefficiente	Valor-P	Coefficiente	Valor-P
<i>Lineal</i>						
<i>pH</i>	-0,3011	0,4620	7,5400	0,0012	0,0296	0,0003
<i>S₀</i>	0,7409	0,1018	-3,2302	0,0205	-0,01644	0,0101
<i>E₀/S₀</i>	3,0164	0,0010	6,9410	0,0013	-	0,0019
<i>Cuadrático</i>						
<i>pH²</i>	-2,9736	0,0009	-	0,0026	0,0211	
<i>(E₀/S₀)²</i>	-1,1064	0,0312	-		-	
<i>Interacciones</i>						
<i>pH* S₀</i>	1,4958	0,0425	-7,1623	0,0045	-0,0381	0,0005
<i>pH* E₀/S₀</i>	-1,3822	0,0533	-	-	-	
<i>S₀* E₀/S₀</i>	-1,8422	0,0167	-6,6660	0,0043	-	
<i>Falta de ajuste</i>		0,2945		0,1289		0,2612
<i>Total (corr.)</i>		19				

Los valores de “b” decrecen cuando la hidrólisis ocurre en concentraciones de sustrato elevadas, lo cual se detecta por el coeficiente negativo para la concentración de sustrato en la Ecuación (2.8), con valor $p < 0,05$. Sin embargo, no existe relación estadística significativa entre estos valores y el GH. En términos generales existe una fuerte tendencia a que los valores más bajos de “b” se registran cuando mayor es el GH, lo que sin duda indicaría mayor afinidad de la Alcalasa 2,4 L con la fracción globular de sangre bovina, independientemente del mecanismo cinético expuesto. Para soportar estadísticamente esta afirmación se sugiere disminuir el error en la determinación de los parámetros de ajuste, utilizando un mayor número de puntos en cada curva de hidrólisis.

La constante “a” presenta relación estadística significativa con el pH y la E_0/S_0 , pues se reportan importantes incrementos de la velocidad inicial de hidrólisis en la medida en que estas variables aumentan. Valencia *et al.*, sugieren que las constantes cinéticas “a” y “b” se pueden utilizar para comparar y caracterizar la eficacia de la proteasa y la susceptibilidad a la hidrólisis por parte de los sustratos (Valencia *et al.*, 2015).

Los modelos estadísticos ajustados con sus coeficientes calculados por regresión múltiple, se muestran en las Ecuaciones (2.6-2.8). Estos modelos son resultado de la exclusión de términos no significativos ($p > 0,05$), conservando en cada caso la jerarquía de los mismos.

2.3.3. Maximización del GH para la hidrólisis enzimática del FG bovina

El modelo de la Ecuación (2.6) se sometió a un proceso de optimización, para maximizar el GH. En la Tabla 2.4, se muestran los resultados de la optimización empleando MSR, aquí se registran los valores óptimos de los factores evaluados (codificados y reales) y el GH (variable respuesta) predicho frente al valor experimental obtenido. La Figura 2.1, muestra el gráfico de superficie de respuesta del (GH) en función de los factores más significativos en el estudio (pH y E_0/S_0). En este caso la relación concentración de sustrato (S_0) se fijó en su máximo nivel codificado, mientras que el pH y E_0/S_0 se establecieron en los ejes X y Y de la gráfica. El GH corresponde a una superficie curva, debido a la importancia de los efectos de segundo grado. La optimización numérica de GH, por MSR entregó un valor de 38 %, para condiciones de pH= 8,14; $S_0= 6,64$ y $E_0/S_0= 14,73$.

$$GH = 29,95 - 0,30pH + 0,74S_0 + 3,02 E/S_0 - 2,97pH^2 + 1,5pH * S_0 - 1,38pH * E_0 - 1,84S_0 * E/S_0 - 1,11 E/S_0^2 \quad (2.6)$$

$$a = 9,79 + 7,53pH - 3,23S_0 + 6,94 E/S_0 - 7,16pH * S_0 - 6,67S_0 * E/S_0 \quad (2.7)$$

$$b = 0,16 + 0,03pH - 0,02S_0 + 0,02pH^2 - 0,04pH * S_0 \quad (2.8)$$

Para confirmar la validez del modelo estadístico propuesto, se llevaron a cabo tres corridas experimentales bajo las condiciones óptimas establecidas, encontrando que el GH experimental fue de $36,25 \pm 0,31$ %, lo que representa un error relativo de 5,03 % con respecto GH esperado. La prueba de falta de ajuste con $p > 0,05$ y la buena precisión de los experimentos sugiere que efectivamente los valores encontrados de los niveles para cada factor evaluado, son condiciones óptimas de trabajo para este sistema de reacción.

Tabla 2.4. Condiciones óptimas de los factores experimentales en la hidrólisis enzimática de la FG bovina.

Variables	Condiciones Óptimas		GH (%)	
	Valor Codificado con MSR	Valor sin Codificar con MSR	Predicho	Experimental
pH	-0,8643	8,1	38,08	36,25
S_0 (m/v)	-1,68	6,6		
E_0/S_0 (m/m)	1,68	14,7		

En lo que respecta al GH, el análisis de varianza (ANOVA) demuestra que el modelo representa adecuadamente los datos experimentales, teniendo en cuenta que el R^2 es de 0,9264. Lo que indica que éste describe la influencia de las variables estudiadas sobre el GH de las proteínas de la fracción globular de sangre bovina en un porcentaje satisfactorio de 93% aproximadamente. El estadístico R^2 ajustado es de 87 %, lo cual nos dice que efectivamente los factores estudiados, junto con sus interacciones explican en un porcentaje satisfactorio la variabilidad observada en el GH, por tanto, el modelo propuesto es una buena descripción del fenómeno de hidrólisis enzimática de este sustrato con Alcalasa 2,4 L.

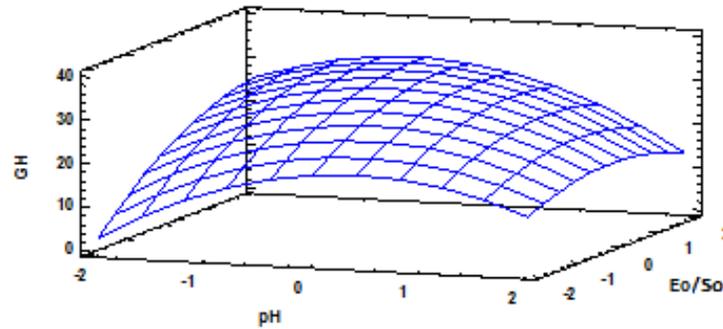


Fig. 2.1. Superficie de respuesta para GH con So constante 10 % (m/V)

Estos resultados muestran, que es importante analizar el efecto del pH y la concentración de sustrato sobre el comportamiento cinético en reacciones de hidrólisis de proteínas, pues estas condiciones ofrecen información de gran valor en el análisis del rendimiento de estas reacciones, lo cual permite avanzar en criterios de identificación de condiciones de trabajo ideales para la identificación de fracciones peptídicas de interés bioactivo.

2.3.4. Capacidad antioxidante

Se determinaron las capacidades antioxidantes de la FG y sus hidrolizados en las condiciones óptimas del diseño a diferentes tiempos de hidrólisis, además, se simuló la digestión *in vitro* para ver el efecto que tiene sobre la capacidad antioxidante. Los resultados con sus respectivas desviaciones se muestran en la Tabla 2.5, los valores están dados en $\mu\text{mol ET/g}$ proteína. Las medias (3 réplicas) de la misma columna con diferente superíndice difieren significativamente ($p < 0,05$).

En las actividades antioxidantes por lo métodos ORAC y FRAP existieron diferencias significativas entre los hidrolizados sin digestión a diferentes tiempos ($p < 0,05$). Mientras en el análisis de ABTS los hidrolizados sin digestión no difieren entre ellos ($p < 0,05$). Esto quiere decir que para obtener la mayor capacidad de reducción de radicales libres de Oxígeno y Fe se debe efectuar a un tiempo de hidrólisis de 2 horas bajo las condiciones óptimas, mientras que para obtener la máxima capacidad de los agentes antioxidantes de los hidrolizados de FG de sangre bovina para atacar el catión radical ABTS^+ basta con ejecutar la hidrólisis enzimática a 30 min, o cualquier otro tiempo estudiado.

Es claro que no es posible hacer comparaciones ni equivalencias entre los distintos métodos que analizan la actividad antioxidante, debido a los diversos mecanismos de acción de los antioxidantes de origen biológico que involucran procesos químicos variados (Prior, 2015). De igual manera, existen diferentes metodologías y/o diferentes unidades de expresión de capacidad antioxidante, lo que dificulta las comparaciones entre diferentes reportes de literatura (Samaranayaka & Li-Chan, 2011). Se ha evidenciado que la capacidad antioxidante de alimentos provenientes de fuentes proteicas independientemente de la metodología, son menos propensos a la capacidad de reducción del ion Fe^{+3} , que a la capacidad de captación de radicales ABTS y peroxilo (Gomez *et al.*, 2013), como efectivamente se comprobó en este estudio, puesto que a pH ácido (3,6), los registros de actividad antioxidante empleando el método FRAP son sustancialmente bajos. Aquí se debe tener

en cuenta que el ensayo FRAP es diferente de los ensayos ORAC y ABTS porque no hay radicales libres u oxidantes implicados (Cao & Prior, 1998).

Tabla 2.5. Capacidades antioxidantes con los métodos ORAC, FRAP y ABTS de la FG de sangre bovina, sus hidrolizados antes y después de digestión *in vitro* a diferentes tiempos de hidrólisis

<i>Tipo Muestra</i>	<i>ORAC</i>	<i>FRAP</i>	<i>ABTS</i>
FGSH	-	45,2 ± 2,5 ^a	608,9 ± 4,1 ^a
FGPD	-	45,7 ± 1,8 ^a	1038,22 ± 9,5 ^c
FG30SD	461,2 ± 37,7 ^a	54,8 ± 2,2 ^b	747,5 ± 68,5 ^b
FG30PD	-	81,8 ± 5,1 ^d	1417,75 ± 4,1 ^e
FG60SD	464,2 ± 14,0 ^a	57,4 ± 1,8 ^b	725,6 ± 56,0 ^b
FG60PD	-	70,4 ± 2,1 ^c	1396 ± 6,3 ^e
FG120SD	513,7 ± 8,2 ^b	65,3 ± 5,8 ^c	748,3 ± 71,3 ^b
FG120PD	-	64,8 ± 2,4 ^c	1245,6 ± 7,2 ^d

La digestión *in vitro* tuvo un efecto significativo favorable para la captación de radicales ABTS por parte de los hidrolizados, mientras que no afectó la captación de los mismos radicales por parte de la FG sin hidrolizar. Así mismo, se favoreció la capacidad de reducción del ion Fe⁺³, tanto para la fracción globular sin hidrolizar como para sus hidrolizados a diferentes tiempos de hidrólisis, posiblemente porque durante el proceso de digestión *in vitro* se liberan péptidos con capacidad antioxidante (Borawska et al., 2016; Zhu et al., 2008).

2.4. CONCLUSIONES

(1) La hidrólisis enzimática (GH) de proteínas de la fracción celular de la sangre de bovino con la enzima Alcalasa 2,4 L se ve afectada por el pH, la concentración inicial de sustrato y la relación enzima sustrato, llegando al máximo GH cuando se trabaja pH: 8,16; S: 6,6 y E₀/S₀: 14,7. (2) La actividad antioxidante de los hidrolizados de la fracción celular de la sangre depende del tiempo de hidrólisis, siendo el tiempo de 2 h el que mayores actividades antioxidantes genera. (3) La digestión *in vitro* puede favorecer la actividad antioxidante de los hidrolizados de la fracción celular de sangre bovina.

NOTACIÓN

FG	Fracción globular
GH	Grado de hidrólisis
FGSH	Fracción globular bovina sin hidrolizar
FGPD	Fracción globular bovina con digestión
FG30SD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 30 min sin digestión
FG30PD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 30 min por digestión
FG60SD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 60 min sin digestión
FG60PD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 60 min por digestión
FG120SD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 120 min sin digestión
FG120PD	Hidrolizado de Fracción globular bovina 120 min por digestión
MSR:	Metodología superficie de respuesta

REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins* (E. applied science Publishers (ed.); 1st ed.).
- Bah, C. S. F., Bekhit, A. E.-D. A., Carne, A., & McConnell, M. A. (2013). Slaughterhouse Blood: An Emerging Source of Bioactive Compounds. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(3), 314–331. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12013>
- Borawska, J., Darewicz, M., Pliszka, M., & Vegarud, G. E. (2016). Antioxidant properties of salmon (*Salmo salar* L.) protein fraction hydrolysates revealed following their ex vivo digestion and in vitro hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(8), 2764–2772. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7441>
- Cao, G., & Prior, R. L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44(6), 1309–1315. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.6.1309>
- Demirhan, E., Apar, D. K., & Özbek, B. (2011). A Kinetic Study on Sesame Cake Protein Hydrolysis by Alcalase. *Journal of Food Science*, 76(1), C64–C67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01938.x>
- Figuroa, O. A., Zapata, J. É., & Gutiérrez, G. A. (2012). MODELING OF THE KINETICS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BOVINE PLASMA PROTEINSS. *Revista EIA*, 17, 71–84. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-12372012000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Gómez, L. J., Figuroa, O. A., & Zapata, J. E. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de alcalasa® 2.4 L. *Informacion Tecnologica*, 24(1), 33–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000100005>
- Hyun, C.-K., & Shin, H.-K. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, 36(1–2), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00176-X)
- Karami, Z., & Akbari-adergani, B. (2019). Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 535–547. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
- Márquez, M. C., & Vázquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35(1–2), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00041-2)
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & L. Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Prior, R. L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*, 18, 797–810. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Rubio, F. C., Tello, P. G., Cuadrado, V. F., Dueñas, M. P., & Moreno, M. C. M. (1993). Hidrólisis de caseína con alcalasa. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 33(1), 59–70. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=717188>
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433–1440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.003>
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.05.006>
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2010.06.020>
- Shi, D., He, Z., & Qi, W. (2005). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, 40(5), 1943–1949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., & Almonacid, S. (2015). Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 50(4), 589–597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, Radical Scavenging, and Chelation Properties of in Vitro Digests of Alcalase-Treated Zein Hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714–2721. <https://doi.org/10.1021/jf703697e>

CAPÍTULO 3. EL ROL DE LA RELACIÓN ENZIMA-SUSTRATO EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE HIDROLIZADOS DE PLASMA BOVINO

RESUMEN

Se realizó la hidrólisis enzimática de plasma bovino entero sin dializar en un reactor por lote con capacidad de 0,5 L a diferentes concentraciones de sustrato y enzima inicial. El método usado para el control de la hidrólisis fue el pH stat. Las condiciones constantes de operación fueron: T=61°C y pH 9, durante un lapso de dos horas, usando Alcalasa 2.4 L como enzima reactante en tres niveles desde 150 a 600 mg/mL y sustrato de 5,10-20 g/L. El objetivo del trabajo fue analizar la capacidad antioxidante (medida con FRAP y ABTS) y el potencial quelante de hierro a través del tiempo en las distintas condiciones de enzima y sustrato. Los hidrolizados con mayor actividad fueron separados de acuerdo a su tamaño molecular a razón de >100, 10-100, <10 y <3 KDa para verificar la capacidad antioxidante aportada por cada uno de ellos. La actividad antioxidante es mayor a concentraciones medias de enzima, mientras que a sustratos intermedios el potencial de fracciones peptídicas con capacidad para neutralizar cationes ABTS⁺ es mayor que el obtenido con otros niveles para el mismo tiempo de reacción. El incremento en el GH favorece la actividad antioxidante medida por el método ABTS, así como la actividad quelantes de metales de los hidrolizados. Una mayor actividad antioxidante se presenta en las fracciones peptídicas <1kDa, obtenidas con una concentración de enzima intermedia. Esta actividad parece estar relacionada con la presencia de péptidos de alta hidrofobicidad en la mezcla.

Palabras clave: hidrólisis enzimática; lactosuero; Alcalasa; proteínas; péptidos antioxidantes.

3.1. INTRODUCCIÓN

Los problemas del sistema antioxidante endógeno ocurren de manera natural en los procesos fisiológicos asociados a la respiración aerobia. Las especies reactivas del oxígeno (ROS) se producen como metabolitos de estas reacciones. Sin embargo, cuando ocurren desbalances entre estas especies y el sistema de defensa antioxidante, se pueden presentar daño a nivel celular (Z. Wang et al., 2021). En los organismos vivos, la protección contra los ROS se realiza a través de diferentes tipos de compuestos, entre los que se cuentan los péptidos. Los antioxidantes sintéticos convencionales (BHA, BHT y n-propilo galato) muestran una fuerte actividad contra varios sistemas oxidantes, pero presentan estricta regulación en su uso por su relación con riesgos potenciales a la salud (Sabeena Farvin et al., 2014). La industria de alimentos y la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos coinciden en que el desarrollo de investigación en compuestos bioactivos de origen alimenticio es un área clave para la mejora de la salud humana (Korhonen & Pihlanto, 2006). Actualmente es tendencia en el mundo, la producción y el empleo de productos naturales antioxidantes cuya actividad se lleve a cabo no solo en los alimentos envasados, sino también, una vez el alimento ha sido ingerido, dado que ha sido probada la relación entre la ingesta de compuestos antioxidantes y la prevención de enfermedades (Corpuz et al., 2022).

Los péptidos antioxidantes son también usados para prevenir oxidación en los alimentos y en tal sentido funcionan como aditivos en alimentos mejorados, pues son capaces de cumplir, además de las funciones nutricionales, funciones de conservación en las matrices alimentarias donde están presentes. Esta función se asocia con la capacidad de los péptidos para inhibir la peroxidación lipídica y la capacidad de quelar iones metálicos (Sarmadi & Ismail, 2010).

Diferentes estudios han establecido la relación existente entre la actividad biológica de los péptidos y su peso molecular. En particular las fracciones de péptidos con pesos moleculares entre 1 - 4kDa serían las más interesantes para usos nutricionales y/o farmacéuticos (Saidi et al., 2014b). Tanto la ultra como la nanofiltración son tecnologías utilizadas con relativo éxito para purificar péptidos con efectos bioactivos de hidrolizados de proteínas lácteas, soya y sustratos vegetales (de Castro & Sato, 2015). El funcionamiento óptimo de estas técnicas de separación está condicionado por las características del sustrato y la efectividad de ruptura de enlaces en las reacciones de hidrólisis enzimática, que depende en gran medida de la enzima empleada y de las condiciones de operación de los sistemas de reacción.

La sangre bovina es considerada un subproducto de la industria cárnica producida en gran cantidad y con escaso valor industrial, pero con un alto contenido proteico. En particular, la fracción de plasma se puede separar fácilmente de la fracción roja mediante centrifugación y representa alrededor del 60-70 % del volumen total de sangre y contiene aproximadamente el 8 % de la proteína total de la sangre bovina (Duarte et al., 1999). El plasma bovino (PB) posee un importante valor biológico, en especial por su variada y gran cantidad de proteínas, representada principalmente en: albúminas, inmunoglobulinas, α y β -globulinas y fibrinógeno (Duarte et al., 1999), todas las cuales tienen un potencial bioactivo significativo. Entre este potencial, se destaca la capacidad antioxidante que pueden ejercer las proteínas y en especial sus hidrolizados (Elias et al., 2008). Se ha encontrado, por ejemplo, que los hidrolizados de plasma entero bovino, se pueden usar en la mejora de las propiedades antioxidantes de películas comestibles diseñadas a base de soja y girasol (Salgado et al., 2011). Un aumento importante de la capacidad antioxidante, se

estudió también en hidrolizados proteicos ultrafiltrados de albumina y globulinas plasmáticas de cerdo (J.Z. Wang et al., 2008). Desde hace muchos años, los hidrolizados enzimáticos de proteína se han venido usando ampliamente, como ingrediente bioactivo y nutricional en productos alimenticios y funcionales (Marshall, 2004). El auge de esta línea de investigación está motivado por los satisfactorios resultados obtenidos en las evaluaciones *in vitro* e *in vivo* de péptidos antioxidantes derivados de proteínas de distintas fuentes alimentarias y con el empleo de enzimas diferentes.

En particular, la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas posee gran complejidad debido principalmente a: i) la naturaleza variada y muchas veces desconocida de los sustratos (estructuras primarias y terciarias de proteínas distintas), ii) la formación de nuevos sustratos de hidrólisis a medida que la reacción avanza, iii) liberación de péptidos cortos y aminoácidos libres que causan inhibiciones, iv) inactivación de la enzima en el tiempo (Valencia et al., 2015), y v) efectos asociados a la variada reactividad de los enlaces en relación con la enzima usada, así como la accesibilidad de estas a sitios específicos de reacción (estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas) (Fernández et al., 2013).

En realidad, si se quiere producir fracciones peptídicas de interés antioxidante, es importante reconocer que estos fenómenos propios de la hidrólisis proteica afectan los productos y que este efecto se ve influenciado, no solo por condiciones de operación estudiadas comúnmente como el pH y la temperatura, si no por los niveles de sustrato y enzima que se usen. Por ejemplo, aumentar la concentración de sustrato reduce el consumo de agua y energía del proceso. Sin embargo, produce valores bajos de GH final, lo que es aún más complejo, impacta el mecanismo de la hidrólisis (Butré et al., 2014). Esto puede significar formación de péptidos distintos en cada tiempo, con expresiones de capacidad antioxidantes variada. En este estudio se propuso analizar el efecto de los niveles de sustrato y enzima en la expresión antioxidante y el GH de HPB enteros y ultrafiltrados con membranas de diferentes tamaños, empleando Alcalasa 2,4 L. Evaluando, a través de técnicas de análisis *in vitro*: la capacidad de reducción férrica (FRAP), de captación del radical azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) y la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), en un novedoso arreglo de medidas repetidas en el tiempo de hidrólisis, que permitió tomar las muestras en el mismo sistema de reacción a medida que el tiempo avanza. Así, se analizaron de forma independiente los niveles de sustrato y enzima y su relación con la capacidad antioxidante en el tiempo, lo que implica, un análisis con distintos grados de hidrólisis (GHs). Adicionalmente se determinó la capacidad para quelar metales, como el hierro, de los HPB a distintos GHs.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación, se describen elementos relacionados con los controles de los sistemas de reacción, los métodos analíticos realizados y el diseño de experimentos empleado.

3.2.1. Sistema de reacción

La hidrólisis se llevó a cabo en un reactor de vidrio de 0,5 L de capacidad, con chaqueta de circulación de agua para regular la temperatura, conectada a un baño de circulación con regulador termostático MX07R-20 (Thomas Scientific, EE. UU ± 0.07 °C). Para el control del pH y registro

de la temperatura de la reacción, se usó un electrodo combinado de vidrio con diafragma esmerilado fijo, conectado a un titulador automático Titrand 842 (Metrohm, Suiza), operado por ordenador (software Tiamo 1.2.1), como lo muestra la Fig. 1. El medio de reacción fue constantemente agitado utilizando un agitador magnético 801 (Metrohm, Suiza) con velocidad de 400 rpm. La temperatura y el pH en el sistema se mantuvieron constantes con valores óptimos de 61 °C y 9, respectivamente. De acuerdo con resultado de estudios anteriores (datos no mostrados).

3.2.2. Materiales y Reactivos

Se empleó plasma bovino líquido obtenido por centrifugación de sangre bovina fresca a 5.000 RPM por 10 min a 2°C, suministrada por un distribuidor local en la ciudad de Medellín-Colombia. El plasma tiene un porcentaje de proteína de $8,76 \pm 0,67$ % (m/V) determinado por el método de Lowry modificado (Winters & Minchin, 2005). Este dato fue corroborado mediante el método de Kjeldahl (AOAC 2005, 954.01), empleando 6,25 como factor de conversión para la estimación del contenido proteico. Como enzima se utilizó Alcalasa 2.4 L (2,4 AU-A/g). Preparado comercial de grado alimentario (Novozymes, Dinamarca), conformada principalmente por Subtilisina A (Subtilisina Carlsberg) una endoproteasa de *Bacillus licheniformis*.

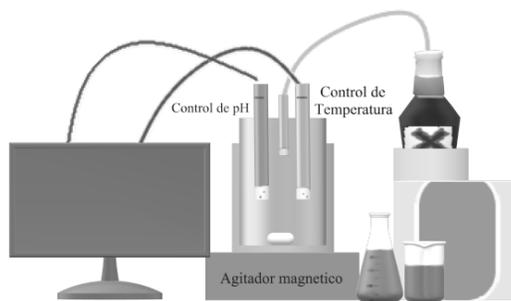


Figura. 3.1. Esquema del sistema de reacción de hidrólisis utilizado en el experimento.

3.2.3. Proceso de hidrólisis enzimática

La reacción se llevó a cabo mediante hidrólisis enzimática controlado con el método pH-stat, reconocido como el más empleado en hidrólisis enzimática por su simplicidad (Rutherford, 2010), el cual consiste en mantener el pH constante mediante la adición de base o ácido diluido. Para este caso, por ser una reacción alcalina se utilizó NaOH 1 M. En principio, la base agregada para mantener constante el pH, neutraliza únicamente los protones liberados durante la ruptura del enlace amida de las proteínas y los péptidos a pH alcalino, que son sustituidos por el catión de la base; de este modo los protones generados por la hidrólisis son equivalentes a los moles de la base añadida (Adler-Nissen, 1986). La estimación del GH se hizo empleando la ecuación (3.1).

$$GH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_b}{M_p \times \alpha \times h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (3.1)$$

Dónde: h = Número de enlaces peptídicos hidrolizados; H_{tot} = Número total de enlaces de péptidos en el sustrato de la proteína (eq/Kg); V_{NaOH} = Volumen de NaOH total (L), N_b = Normalidad de la base, M_p = masa de la proteína (en kg), GH = grado de hidrólisis.

El grado de disociación de los grupos α -NH₂ liberados en la reacción, α , se calcula directamente de la ecuación (3.2), y depende del pH de trabajo y del pK. Este último varía de forma significativa con la temperatura de reacción y puede estimarse de acuerdo con la ecuación (3.3). Se empleó un α calculado de 0,992 y un h_{tot} de 8,3 meq/g que ha sido reportado para proteínas del lactosuero (Adler-Nissen, 1986).

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{\text{pK} - \text{pH}}} \quad (3.2)$$

$$\text{pK} = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (3.3)$$

Dónde: α = Grado de disociación de la proteína y T= temperatura de trabajo en Kelvin.

3.2.4. Descripción del diseño

En el análisis se verificó la influencia de la enzima inicial “E₀” (niveles de: 150, 300 y 600 mg/L) y del sustrato inicial “S₀” (niveles de: K_m/2, K_m y 2K_m g/L) a través del tiempo de reacción (0-120 min), sobre la capacidad antioxidante in-vitro (ABTS y FRAP) y la capacidad quelante de hierro (CQFe). Se realizó un análisis comparativo de la evolución de las distintas variables dependientes en dos grupos de experimentos: A) variando S₀ y manteniendo constante E₀; B) manteniendo constante S₀ y variando E₀, según se indica en la tabla 3.1. Los niveles de la concentración de sustrato coinciden con la región cercana al valor de K_m, donde se presenta la mejor afinidad de la enzima por el sustrato. Mientras que los niveles de enzima empleados fueron definidos por ensayos previos no publicados. En el análisis, se utilizó un ANOVA de medidas repetidas con un factor intra-sujeto (tiempo: 0, 10, 20,75 y 120 min) y un factor inter-sujeto (S₀ ó E₀ para cada experimento), con nivel de significación estadística de 0,05. Cada experimento de hidrólisis, a las condiciones fijadas por el diseño, se realizó por triplicado.

A cada tiempo indicado, se tomó una alícuota de 5 mL. La enzima fue desactivada a 90 °C por 10 min. Las muestras fueron conservadas a -20 °C para su posterior uso en los análisis in -vitro de las actividades antioxidantes evaluadas.

3.2.5. Potencial bioactivo del hidrolizado

3.2.5.1. Potencial bioactivo del hidrolizado

Se realizó siguiendo el método descrito por Re et al. (1999), en el cual 100 μ L de la muestra o estándar Trolox, se mezclaron con 1000 μ L de la solución ABTS. Luego se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. La absorbancia se registró a 730nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys™ 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE.UU.), empleando solución de Trolox de concentraciones 0- 200 μ M como patrón. Los resultados se expresaron como micromol de equivalentes Trolox por gramo de proteína (μ mol ET/g).

Tabla 3.1 Condiciones de trabajo (niveles de variables de control y variables dependientes) para los experimentos realizados: A) sustrato variable y B) enzima variable.

Experimento	A)	S ₀ (g/L)		Factor intra-sujeto tiempo (min)				Variables de Respuesta
		Bajo	K _m /2	t1=10	t2=20	t3=75	t4=120	
E ₀ (300 mg/L)		Medio	K _m					
		Alto	2K _m					
Experimento	B)	E ₀ (mg/L)		t1=10	t2=20	t3=75	t4=120	Variables de Respuesta
		S ₀ (K _m g/L)	Bajo					
S ₀ (K _m g/L)			150					ABTS; FRAP
			300					
			600					

3.2.5.2. Determinación de actividad antioxidante FRAP

Se determinó por la metodología descrita por Pulido et al. (2000), 900 µL del reactivo FRAP (con TPTZ, FeCl₃ y tampón acetato 3 M), se mezclaron con 90 µL de agua destilada y 30 µL de la muestra o estándar Trolox y se incubaron a 37 °C en un baño seco por 30 min. Se midió el incremento en la absorbancia a 595 nm, empleando un espectrofotómetro Genesys™ 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE.UU.), contra un blanco de buffer acetato de sodio. Se empleó una solución de Trolox de concentraciones 0-300 µM como patrón. Los resultados se expresan como micromol de equivalentes Trolox por gramo de proteína (µmol ET/g proteína).

3.2.5.3. Determinación de actividad antioxidante ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

El método mide el efecto estabilizador de los radicales libres sobre los compuestos antioxidantes mediante el mecanismo de donación de un átomo de hidrógeno. Se empleó la metodología descrita por Ou et al. (2001). Se mezclaron 150 µL de fluorescina 1 µM (sustrato fluorescente) y 25 µL de muestra (diluidos en buffer fosfato 10 µM a pH 7,4 hasta una concentración de proteínas de 0,2 mg/mL). La mezcla fue preincubada por 30 min a 37° C. Luego 25 µL de una solución de 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) 250 mM fue adicionada. La intensidad de la fluorescencia fue medida con longitudes de onda de excitación y emisiones fijas de 485 y 520 nm, respectivamente (Ou et al., 2001)

3.2.6. Actividad quelante de hierro

Se empleó el método descrito por (Decker & Welch, 1990), con algunas modificaciones. Se mezcló 1 mL de la muestra con 20 µl de una solución de FeSO₄•7H₂O 2mM. La mezcla se agitó y dejó en reposo durante 5 minutos. Se adicionó 40 µl de una solución de ferrozina 5mM y se agitó vigorosamente. Se esperó por 10 min y se leyó la absorbancia a 562 nm. El porcentaje de quelación se calculó de acuerdo a la ecuación 3.4.

$$\% \text{ Quelación} = \left[\frac{\text{ABS control} - \text{ABS muestra}}{\text{ABS control}} \right] \times 10 \quad (3.4)$$

3.2.7. Purificación de fracciones peptídicas por ultra centrifugación (UF)

Los hidrolizados que mostraron mayor actividad antioxidante fueron desalados en columnas C18 Sep-Pak de 35 mL (Water, EE. UU). Usando agua ultra pura. Para la recuperación de fracciones proteicas de la columna, se empleó ACN 80-100%. El solvente fue retirado por evaporación al vacío (50°C y 720 mmHg). Estas muestras se reconstituyeron en agua pura y se sometieron a concentraciones sucesivas por ultra centrifugación utilizando tubos Amicon Ultra-15 (Merck Millipore, Alemania), con membranas PLHK Ultracel-PL, con un volumen de 15 mL y membranas de: 100, 10 y 3 kDa. Se centrifugaron a 5000 x g durante 20 min en una centrifuga Modelo U- 320 (BOECO, Hamburg, Alemania). Se obtuvieron cuatro fracciones (>100 kDa; 10-100 kDa; <10 kDa y <3 kDa), las cuales, fueron almacenadas a -20°C, para análisis posteriores. La actividad antioxidante de las fracciones fue nuevamente determinada mediante métodos de FRAP, ABTS y ORAC.

3.2.8. Cromatografía líquida (HPLC-RP) de hidrolizados ultrafiltrados

Para purificación cromatográfica, se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución (Agilent 1200, Agilent Technologies Inc., California, EE. UU.), equipado con un detector UV de matriz de diodos operando a 214 nm y a temperatura ambiente. Todas las muestras se filtraron a través de Filtros de PVDF (Millipore) de 0,45 µm antes de la inyección (20 µL) en una columna Zorbax 300SB-C18 (9,4 mm × 250 mm, 5 µm, Agilent, EE. UU). Como eluyente A se utilizó 5% (v/v) de ACN que contiene 0,03% (v/v) de TFA y el eluyente B fue 90% (v/v) de ACN con 0,03% de TFA (v/v). Las muestras fueron eluidas con un flujo constante de 1 mL/min. El perfil de elución fue: entre 0-1 min se empleó 100% de A. Entre 1-10 min un gradiente lineal de 0-70 de B. Entre los 10-15 min una gradiente lineal de B de 70-100%, seguido de un gradiente lineal con 100% B hasta el min 20 y regreso a 100 % A para los 25 min. De acuerdo con los resultados el cromatograma se dividió en tres regiones, resaltando las zonas ricas en fracciones peptídicas con baja, media y alta hidrofobicidad, respectivamente. Estas fracciones fueron también recuperadas y analizadas en cuanto a su actividad antioxidante de acuerdo con las técnicas mencionadas

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados del comportamiento cinético, el diseño experimental y las actividades en función del tiempo, para diferentes concentraciones de enzima y de sustrato.

3.3.1. Cinética de hidrólisis enzimática de HPB- Alcalasa 2.4 L

La constante de afinidad (K_m) y la velocidad máxima de hidrólisis (V_{max}) para el sistema de reacción PB- Alcalasa 2.4 L se determinaron a través del análisis de saturación de la enzima en un rango amplio de S_0 (1-20 g/L). La curva se construyó utilizando una concentración de enzima fija de 225 mg/L. Para la construcción de la curva de saturación se registraron los valores de velocidad inicial para cada concentración inicial de sustrato. La velocidad inicial se determinó como la pendiente de la curva en el tramo inicial de la reacción, expresada como la concentración (mM) de enlaces aminos hidrolizados (α -NH) (determinados por método pH-Stat) contra el tiempo (min). Cada curva fue realizada por duplicado.

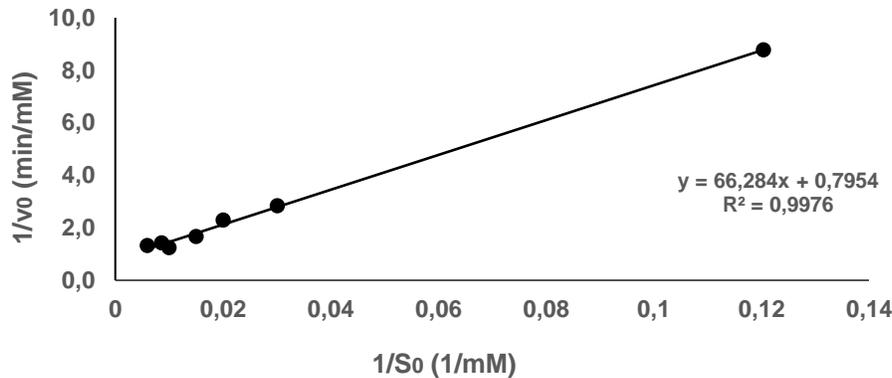


Fig. 3.2 Representación gráfica de inversos de velocidad inicial ($1/v_0$) a distintas concentraciones de sustratos ($1/S_0$ de 1-20 g/L) según Lineweaver-Burk.

Los resultados registran un comportamiento típico para un sistema de saturación enzimática sin evidencia de efectos de inhibición por sustrato en los rangos de la concentración evaluada, tal como se muestra en la gráfica de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (Fig. 3.2). Para el sistema de reacción PB- Alcalasa 2.4 L se obtuvo un valor de $V_{\max} = 1,2572$ mM/min y un $K_m = 10$ g/L, los cuales fueron obtenidos con un coeficiente de determinación significativo ($R^2 = 0,9976$).

3.3.2. Efecto de los niveles de enzima y sustrato añadida

El valor del K_m representa una medida de afinidad entre Alcalasa 2.4 L y el sustrato, esta concentración de sustrato se tomó como referencia para analizar el efecto de la concentración de enzima sobre la actividad antioxidante (FRAP y ABTS) en distintos tiempos de hidrólisis (Exp B). En un segundo experimento (Exp A) se tomó el nivel de enzima intermedio (establecido a través de ensayos previos) y la concentración de sustrato varió entre $K_m/2$ y $2K_m$.

En la tabla 3.2 se muestran los p-valores para las distintas pruebas estadísticas. En los resultados del análisis multivariado, los cuatro estadísticos: Traza de Pillai, Lambda de Wilks, Traza de Hotelling y Raíz mayor de Roy, indican que el factor tiempo es significativo ($p < 0,005$), tanto para los valores de la actividad antioxidante medidas por ABTS como por FRAP en los dos experimentos A y B. De manera similar, la mayoría de los estadísticos multivariados, con excepción de estadístico Traza de Pillai ($p > 0,076$), indican efecto significativo en la interacción Tiempo* E_0 para la actividad medida con ABTS. Por otro lado, desde el análisis multivariado, en los dos experimentos, no parece haber contundencia ($p > 0,05$ para algunos estadísticos como: Lambda de Wilks y Traza de Hotelling) en la significancia estadística de los efectos de interacción Tiempo* E_0 sobre los resultados medidos por FRAP y ABTS).

Entre tanto, en el Exp B, el nivel crítico para la prueba de esfericidad de “W de Mauchly” resultó mayor que 0,05. Tanto para los resultados medidos por ABTS como por FRAP, podemos asumir esfericidad y por lo tanto analizar los resultados de los efectos del factor intra-sujeto: tiempo, sobre la actividad antioxidante medida por los métodos FRAP y ABTS, utilizando la aproximación univariada. En el caso del Exp A, el nivel crítico para la prueba de esfericidad de “W de Mauchly” resultó significativa $p < 0,05$. Confirmando los resultados del análisis multivariado referido a los efectos de la interacción Tiempo* E_0 .

Según los resultados de la tabla 3.2, en el Exp B, desde el análisis univariado, existe un efecto individual del tiempo (confirmando los resultados obtenidos por la aproximación multivariada) y su interacción con los niveles de enzima empleados (en contraste con la aproximación multivariada para algunos casos) sobre la respuesta evaluada (potencial antioxidante), tanto si asumimos esfericidad, como utilizando dos de los correctores épsilon (Greenhouse-Geisser y Huynh-Feldt), pues en todos los casos se obtienen p -valores $\leq 0,006$. En lo referido al factor inter-sujeto: concentración de enzima inicial añadida (E_0), los resultados indican que tanto la actividad medida por FRAP (p -valor=0,000), como la medida por ABTS (p -valor $<0,003$) son distintas en los niveles analizados.

Por su parte, en el Exp A, según el análisis univariado, existe un efecto individual del tiempo (confirmando los resultados obtenidos por la aproximación multivariada) sobre las respuestas medidas por FRAP y ABTS. Mientras que, en definitiva, no parece haber efectos de la interacción Tiempo* S_0 , sobre la actividad antioxidante medida por FRAP. Lo que sí se confirma para la respuesta medida por ABTS en este caso.

En el experimento B). En el análisis de comparaciones múltiples el nivel crítico ajustado con la corrección de Bonferroni, indica que en general, la respuesta de la actividad antioxidante medida por ABTS, es significativamente ($p<0,019$) distinta, en cada combinación de tiempo, con excepción de los valores obtenidos entre t_3 y t_4 ($p=0,189$). Tiempo en el cual, se ha alcanzado en promedio el 50% del GH máximo para cada nivel de enzima analizado en el estudio (Fig. 3.3A).

El análisis de la evolución de la actividad ABTS entre pares del factor E_0 , muestra que existe una tendencia de aumento con diferencias medias significativas ($p<0,005$). Este aumento guarda estrecha relación con el valor de GH alcanzado en cada factor, en dicho tiempo. Como es de esperar en reacciones de este tipo: a mayor cantidad de enzima, mayor GH alcanzado para el mismo tiempo de reacción y por lo tanto mayor actividad Antioxidante. Sin embargo, a los 75 min de reacción se puede observar que no existe diferencias entre los valores de ABTS en los niveles medios y altos ($p=1,00$) de enzima evaluados, aunque los valores GHs alcanzados son sustancialmente distintos (mayores para el nivel de enzima alto comparados con el medio) ($p<0,05$). Incluso, en el tiempo final (t_4), los valores de ABTS no parecen ser diferentes en magnitud, pese a que exista una diferencia de GHs importante, tal como se ve en la Fig. 3.3B. Es de destacar con este resultado que, a medida que se usa menos enzima, el valor de ABTS máximo se alcanza con un menor GH, aunque no necesariamente en el menor tiempo.

En lo que respecta a los resultados obtenidos por la técnica FRAP, los valores son sustancialmente distintos en los estados iniciales de la reacción cuando el sistema es operado con un nivel intermedio de enzima. Los resultados de actividad antioxidante medidos por FRAP son iguales ($p>0,271$) en los tres niveles de tiempo (t_1 , t_2 y t_3). Pese a que los GHs alcanzados en cada tiempo en los distintos niveles de enzima evaluados son del orden de los 6-9 unidades. Es decir, un mayor GH para este caso, no garantiza una mayor actividad antioxidante de los hidrolizados, medida por FRAP. A diferencia de los resultados de ABTS, estos resultados sugieren que un máximo de valores de FRAP solo se logra con un nivel de enzima intermedio, cuando el GH=15%.

En el experimento A). En lo relacionado con los cambios en los niveles de sustrato, tanto el análisis multivariado como el univariado, concuerdan en que el tiempo tiene efecto significativo sobre las actividades antioxidantes FRAP y ABTS. Sin embargo, la interacción del tiempo con el sustrato no parece tener efecto en el caso de la respuesta medida por FRAP, según lo indican los valores-p del experimento A en tabla 3.2.

Comparaciones múltiples muestran que en la actividad ABTS medida existe una tendencia inicial a que la actividad en los hidrolizados mejore, en la medida en que la reacción avanza, para un sistema que opera con una carga baja o media en comparación con el de mayor carga (Fig. 3.4B). En todo caso, cuando menor carga de sustrato hay en el sistema, se alcanzan valores de GHs más altos en menor tiempo. Esto es consistente con un repunte de los valores de actividad en los estadios iniciales e intermedios de la reacción, que contrario a los esperado, se estabilizan pese al avance del GH y al finalizar son sustancialmente menores pese a los elevados GHs obtenidos.

Tabla 3.2. ANOVA de medidas repetidas en el tiempo para los experimentos con sustrato variable (Exp A) y enzima variable (Exp B), con capacidad ABTS y FRAP como respuesta.

Análisis Multivariado						Análisis Univariado				
Factor	TEST	ABTS		FRAP		TEST	ABTS		FRAP	
		(p-valor)		(p-valor)			(p-valor)		(p-valor)	
		Exp A	Exp B	Exp A	Exp B		Exp A	Exp B	Exp A	Exp B
Tiempo	Traza de Pillai	0,005	0,002	0,009	0,00	Esfericidad asumida	0,000	0,000	0,000	0,000
	Lambda de Wilks	0,005	0,002	0,009	0,00	Greenhouse-Geisser	0,000	0,000	0,006	0,001
	Traza de Hotelling	0,005	0,002	0,009	0,00	Huynh-Feldt	0,000	0,000	0,001	0,001
	Rafz mayor de Roy	0,005	0,002	0,009	0,00					
Tiempo* (S ₀ ó E ₀)	Traza de Pillai	0,076	0,170	0,074	0,052	Esfericidad asumida	0,000	0,000	0,098	0,002
	Lambda de Wilks	0,006	0,015	0,097	0,112	Greenhouse-Geisser	0,004	0,000	0,187	0,006
	Traza de Hotelling	0,002	0,004	0,151	0,226	Huynh-Feldt	0,000	0,000	0,151	0,002
	Rafz mayor de Roy	0,000	0,001	0,033	0,109					

Es conocido que en la hidrólisis con Alcasa 2,4 L se favorece la capacidad antioxidante de proteínas. Como se ha evidenciado en numerosos trabajos, el GH aumenta con el tiempo y del mismo modo la capacidad antioxidante mejora (Bah et al., 2016). Esto debido a que la actividad antioxidante es principalmente atribuida a péptidos de tamaño molecular bajo (Saidi et al., 2014). En alguna forma, el GH se ha generalizado como una herramienta indirecta para describir la distribución del peso molecular de los hidrolizados, en tanto que, una hidrólisis prolongada redonda casi siempre en grados de hidrólisis altos y por tanto tamaños peptídicos mucho más pequeños (Morales-Medina et al., 2016). Los resultados obtenidos son parcialmente consistentes con este análisis. Es cierto que, un aumento del GH favorece la actividad antioxidante medida por ABTS y FRAP. Sin embargo, dos aspectos relevantes se derivan de estos resultados:

1. La actividad antioxidante de las fracciones peptídicas hidrolizadas con GHs similares no es necesariamente la misma si estos GHs se logran con combinaciones de niveles de enzima y/o

sustratos distintos. Es decir, es altamente probable que, debido a los fenómenos de selectividad de la enzima, distintas fracciones peptídicas (con poblaciones de péptidos distintas) se formen en el tiempo, en diferentes condiciones de sustrato y enzima de operación del reactor.

2. Estas condiciones de operación (concentraciones variada de enzima y sustrato) afectan de forma conjunta la velocidad de ruptura y la probabilidad de producción de péptidos específicos con susceptibilidad a exponer actividad antioxidante. Lo cual es natural en fenómenos de hidrólisis de polímeros no homogéneos, como las proteínas. Cuando se proyecta el análisis de estos fenómenos frente a potenciales esquemas de producción, es inevitable considerar aspectos técnicos como el costo de la enzima, la reducción en el consumo de agua y el ahorro de energía. Esto significa que, en el estudio completo de la dinámica de ruptura y la obtención de compuestos bioactivos de hidrolizados, no solo es importante tener en cuenta las condiciones de operación, ampliamente indagadas, como el pH, la temperatura y la presencia de sales, en los sistemas de reacción, sino que, se hace necesario analizar a fondo aspectos relacionados con el papel del sustrato y la enzima en el potencial bioactivo.

3.3.3. Relación del GH con el potencial antioxidante en reacciones con sustrato y enzima variada

Hay una tendencia global a favorecer el aumento de la actividad antioxidante *in vitro* en la medida que la hidrólisis avanza, con grandes diferencias en los moles de equivalente trolox registrados por las técnicas FRAP y ABTS. Pues se conoce que las fuentes alimenticias son menos propensas a la reducción del ion Fe^{+3} que a captar radicales ABTS y piróxilo (Gómez et al., 2013).

En las Figuras 3.3 y 3.4 (A y B) se grafica el GH Vs Actividad antioxidante medida por los dos métodos usados en este trabajo. Cada punto que señala un GH corresponde con un punto de tiempo expuesto en el diseño en la tabla 3.1. Actividades antioxidantes importantes (medidas por FRAP y ABTS) se registran en elevados tiempos de reacción.

Esto concuerda con GHs entre los 15-19%. En efecto, los GHs alcanzados son mayores en la medida en que se aumenta la concentración de enzima de operación (ver Fig. 3.3 A y B). Operar el sistema de reacción en los mayores niveles de enzima (en este caso 600 mg/L), aunque representan un mayor índice de escisión total (en el tiempo total de reacción), no necesariamente significa obtener la mayor actividad *in vitro* relativa a la porción de proteína intacta. Pues valores similares e incluso superiores de actividad se obtienen cuando usamos menos cantidad de enzima en la reacción.

Como se ve en la Fig. 3.3A, en los hidrolizados enzimáticos se evidencia una mayor actividad antioxidante medida por FRAP, en el transcurso de la reacción (en los diferentes tiempos analizados), cuando se emplean niveles de enzima intermedios, en comparación con la mayor cantidad usada. Muy a pesar de que los GHs son significativamente menores en estos tiempos de reacción. Con los niveles más bajos de enzima, solo se puede lograr el 50-70 % de la hidrólisis máxima alcanzada con la mayor cantidad de enzima usada.

Por ejemplo, con GH=11,2 %, logrados por hidrólisis con 150 mg/L de enzima se obtienen hidrolizados con cerca de 650 $\mu\text{molTE/g}$ de proteína (medidos por ABTS). Valores

estadísticamente iguales ($p < 0,05$) a los registrados en hidrolizados con $\text{GH} = 19,2\%$, pero obtenidos con la cantidad de enzima más alta, para los mismos tiempos de reacción.

Para GHs iguales o superiores a 15%, los valores de actividad antioxidante medidos por ABTS son del orden de los 600 μmolTE por gramo de proteína, en especial cuando se usan los niveles medios y altos de enzima, lo cual significa emplear del 3-4,5% de Alcalasa, en relación con la masa de proteína total en el sistema de reacción.

Por otro lado, cuando la reacción se lleva a cabo con diferentes concentraciones de sustrato inicial, se puede ver que las actividades antioxidantes ABTS y FRAP tienen comportamientos distintos, como se muestra en las figuras 3.4 (A y B). En el caso de la actividad antioxidante medida por ABTS, a los 20 min (tercer punto de cada curva) se evidencian valores de $\mu\text{molTE}/\text{gramos}$ de proteína, iguales o superiores a 600, en todos los niveles de sustrato. Se destaca que, un valor de actividad superior se registra en el nivel intermedio de sustrato empleado, el cual, como se mencionó, concuerda con la concentración de sustrato donde la afinidad enzima-sustrato es importante (Fig. 3.4B). Este valor de actividad curiosamente se obtiene de hidrolizados con un GH ligeramente inferior al alcanzado con el nivel de sustrato más bajo empleado en la reacción. Mientras con el nivel más alto de sustrato, solo se alcanza un GH de menos de la mitad de la magnitud de los alcanzados con los otros niveles de sustrato analizados. Para el final de la reacción, los hidrolizados obtenidos con la concentración de sustrato intermedio siguen teniendo los valores de actividad medidos por ABTS significativamente más altos, con un $\text{GH} = 16\%$. La operación del sistema de reacción en las concentraciones más bajas de sustrato, a pesar de exhibir una evolución en GHs con el tiempo relativamente mayor e incluso alcanzar GHs finales mayores, no resulta satisfactoria para la obtención de fracciones peptídicas con capacidad para neutralizar cationes ABTS^+ .

En lo que se refiere a la actividad antioxidante medida por FRAP (Fig. 3.4A), se puede observar que todos los hidrolizados alcanzados con el nivel intermedio de sustrato desde los 10 minutos de reacción, resultaron mayores de 100 μmolTE por gramo de proteína. Valores satisfactorios, si consideramos que el método no mide los antioxidantes que contienen grupos SH, tal como algunos aminoácidos, ya que estos no reducen de forma efectiva el Fe^{3+} a Fe^{2+} .

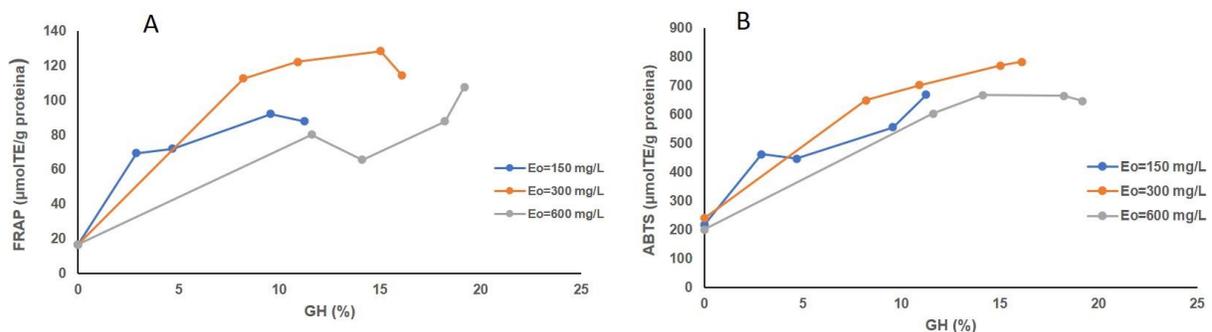


Fig. 3.3. Actividad antioxidante medida por (A) ABTS y (B) FRAP en plasma bovino para diferentes concentraciones de enzima (E_0) Vs. GH, con S_0 constante de 10 g/L.

En los estudios de Seo et al. (2015), la habilidad para captar radicales libres de los hidrolizados de proteína del plasma se explica a través de varios mecanismos: la capacidad de donar hidrógeno, estabilizar radicales, secuestrar iones metálicos prooxidativos y probablemente formar una barrera física alrededor de las gotas de grasa usando un aminoácido particular. Según Saiga et al. (2003), esta capacidad antioxidante está relacionada con la existencia de varios aminoácidos como la tirosina, triptófano, metionina, lisina, histidina y cisteína; sin embargo, no solo la presencia de estos aminoácidos es suficiente para exhibir la actividad, sino que también influyen la estructura primaria de los péptidos y su secuencia de aminoácidos.

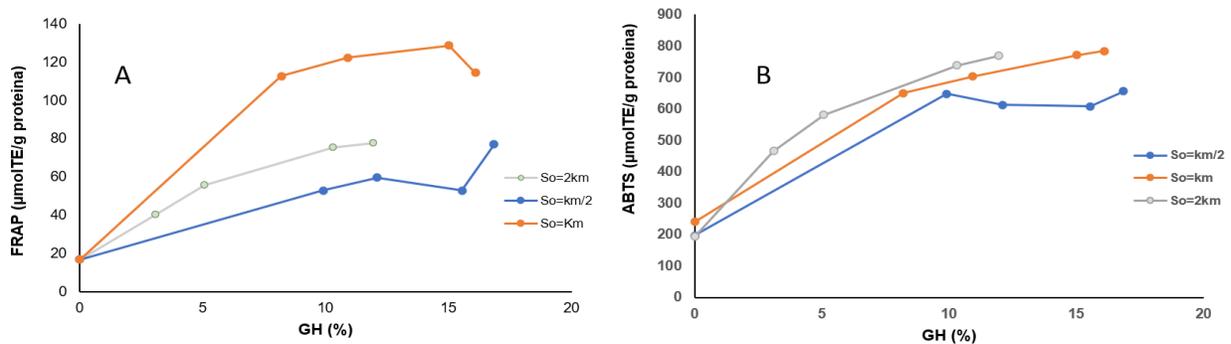


Fig. 3.4. Tendencia de actividad antioxidante medida mediante (A) ABTS y (B) FRAP en plasma bovino para diferentes concentraciones de sustrato (S0) Vs. GH, con E0 constante de 300 mg/L.

Evidentemente muchos de los aminoácidos que conforman la estructura proteica, pueden ejercer efectos antioxidantes específicos, pero dentro de la cadena proteica su actividad puede estar limitada por dificultades de accesibilidad de los oxidantes. Por otro lado, se conoce que los aminoácidos libres no son efectivos antioxidantes y aunque la hidrólisis enzimática puede mejorar la capacidad antioxidante de proteínas, una excesiva hidrólisis puede resultar negativa (Elias et al., 2008). Pietraforte y Minetti (1997) citado en Elias et al. (2008), señalan que los radicales tirosilo se detectan en péptidos que contienen tirosina después del tratamiento con peroxinitrito únicamente si el residuo de tirosina se encuentra en una posición central de una secuencia peptídica relativamente larga. De esta manera, la mayor capacidad de los hidrolizados de proteínas para disminuir la reactividad de un radical libre está relacionada con un aumento en la exposición de los aminoácidos, lo que conduce a un incremento de las reacciones de radicales libres con el péptido y esto potencia su efecto antioxidante.

Butré et al. (2014), encontraron que para hidrolizados con los mismos valores alcanzados de GHs. En este caso, hidrolizados con 1% de sustrato inicial (lactosuero bovino), contienen menos proteína intacta que los hidrolizados del mismo GH, producidos con más altas concentraciones de sustrato inicial, debido a que la afinidad de la enzima hacia la proteína la determina el equilibrio entre la proteína nativa y la desplegada en solución (Deng et al., 2018). Cambios en este equilibrio pueden sugerir cambios en los mecanismos de hidrólisis.

Se ha demostrado que la afinidad de la proteína intacta fue diferente en la hidrólisis con Alcalasa para distintas concentraciones de sustrato, es decir, la composición de estos hidrolizados fue distinta y en efecto, esto se produjo por cambios en la selectividad de la enzima en condiciones

variadas de operación (Butré et al., 2014). Esto puede explicar, por un lado, las diferencias expuestas en las actividades antioxidantes medidas para distintos GHs en niveles distintos de sustrato.

3.3.4. Actividad quelante de hierro y el GH de hidrolizados de plasma bovino

En la figura 5, se muestran los resultados del porcentaje de quelación contra el GH, para la reacción empleando 10 g/L de sustrato y 300 mg/L de enzima. Se observa que, en general, los hidrolizados de PB presentan altos porcentajes de quelación de Fe^+ . Es conocido que la actividad quelante mejora significativamente con el aumento del GH (Zhang et al., 2016). Sin embargo, cuando la hidrólisis enzimática no es prolongada y en donde se espera que estén presentes péptidos de tamaño intermedio y proporciones menores de péptidos de peso molecular bajo, se obtuvieron altos porcentajes de quelación de Fe^+ (87,92 %). En efecto, muchos grupos funcionales en una proteína pueden contribuir a la capacidad para fijar metales (Zhu et al., 2015).

Cadenas laterales de residuos de aminoácidos dentro de estructuras peptídicas como cisteína, serina, histidina, el aspartato y el glutamato pueden servir como ligandos para la unión de metales de transición (Eckert et al., 2014). En principio se ha relacionado el potencial para ligar hierro a hidrolizados de bajo peso molecular, por ejemplo, Eckert et al. (2014), evaluaron el efecto del tamaño de fracciones peptídicas, separando el hidrolizado utilizando membranas y con varias proteasas, las fracciones menores de 1 kDa pueden ser más activas que las mayores. Sin embargo, existe evidencia de que las proteínas hidrolizadas, fracciones y péptidos de diferentes tamaños mejoran el efecto sobre la absorción y biodisponibilidad de calcio y hierro (Walters et al., 2018). En contraste, Tang et al. (2009), observaron que en hidrolizados de proteína de cáñamo un aumento de la longitud de la cadena peptídica podría conducir a mayores efectos quelantes de hierro. Las fuertes propiedades quelantes de metales de los péptidos de cadena larga pueden deberse a los efectos sinérgicos de un mayor número de residuos de aminoácidos en comparación con los péptidos más cortos.

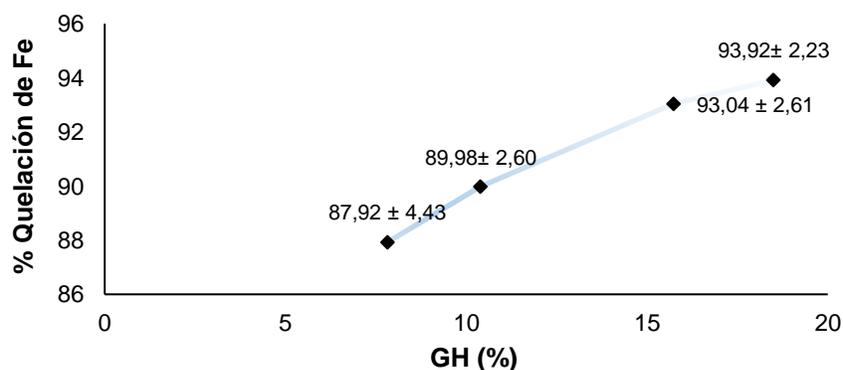


Fig. 3.5. Porcentaje de quelación de Fe^+ Vs. % GH de HPB a Concentración de sustrato 10 g/L, empleando 300 mg/L de enzima

3.3.5. Actividad antioxidante de fracciones ultrafiltradas

Como se ve en los resultados anteriores, el uso de un nivel de enzima elevado no significa necesariamente que se obtenga una mayor actividad antioxidante en los hidrolizados. Pues como se sabe, algunos péptidos antioxidantes, que aparecen en un tiempo en la reacción, pueden ser hidrolizados, en fases sucesivas, hasta fracciones más pequeñas o hasta aminoácidos libres, con menor valor antioxidante (Zou et al., 2016). En teoría la cantidad de enzima en un sistema de reacción solo determina el GH final que se obtiene tras la hidrólisis. Sobre esta base, mientras más enzima se usa, más rápido se hidroliza y, por tanto, se obtienen las fracciones peptídicas de interés con una mayor velocidad. Esto representa, por supuesto, un ahorro de energía por el menor tiempo de operación. Pero, por otro lado, esto también implica un mayor consumo de enzima, en sistemas donde no hay recuperación y reutilización de las misma.

Tabla 3.3. Actividad antioxidante (FRAP y ABTS) de HPB ultrafiltrados de diferentes tamaños, obtenidos con nivel de enzima medio ($E_0=300$ mg/L) y alto ($E_0=600$ mg/L).

FRACCIONES	FRAP $\mu\text{molTE/g}$ de proteína		ABTS $\mu\text{molTE/g}$ de proteína	
	$E_0=300$ mg/L	$E_0=600$ mg/L	$E_0=300$ mg/L	$E_0=600$ mg/L
>10 kDa	121,96 \pm 9,96 *	161,31 \pm 3,48 *	245,09 \pm 101,98	344,63 \pm 41,08
<10 kDa	138,16 \pm 20,53*	240,28 \pm 27,79 *	1570,47 \pm 342	2101,38 \pm 256,76
3-10 kDa	282,96 \pm 24,64*	489,64 \pm 50,87 *	1353,16 \pm 161,63	1122,40 \pm 154,02
<3 kDa	184,21 \pm 29,81	267,25 \pm 45,82	1420,30 \pm 209,73	1465,89 \pm 125,41
<1 kDa	202,84 \pm 26,87*	100,16 \pm 11,65*	2257,41 \pm 351,05*	1181,35 \pm 140,67*

*Indica diferencia mínima significativa entre pares de una misma fila ($p<0,05$).

Los resultados demuestran que, en la práctica, una cantidad de enzima superior puede incluso resultar excesiva en términos de productividad, puesto que mejores actividades antioxidantes para tiempos similares se pueden obtener con menos enzima.

Con este criterio, los hidrolizados enzimáticos de plasma con mayor actividad antioxidante relativa (tanto en los resultados expresados por ABTS como por FRAP) se tomaron como referencia para analizar las diferencias entre los valores de actividad antioxidante de las fracciones peptídicas de distintos tamaños, obtenidas tras hidrólisis a diferentes niveles de enzima (medio y superior). Esto significa hidrolizados obtenidos con GHs diferentes.

Se seleccionaron los hidrolizados del Exp B en el tiempo final (120 min de hidrólisis), obtenidos con los niveles de enzima medio ($E_0=300$ mg/L) y superior ($E_0=600$ mg/L). Estos hidrolizados enzimáticos tienen GH=16 y 19,2% respectivamente (Fig. 3.4 A y B). Con actividad antioxidante FRAP estadísticamente similar, pero con distintos valores de ABTS. En la tabla 3, se muestra los equivalentes trolox, para la actividad antioxidante (FRAP Y ABTS) medidas a las fracciones peptídicas ultrafiltradas en una serie de tamaños distintos.

Los resultados de los ensayos de ABTS sugieren que la fracción con péptidos menores a 1 kDa tienen un efecto reductor de radicales libres sustancialmente alto. Con diferencias significativas entre las fracciones obtenidas con niveles de enzima media y alta. Esto significa que, la operación con niveles intermedios de enzima, produce péptidos de tamaño pequeño, con el doble de capacidad para reducir radicales ABTS+ comparados con los obtenidos en el sistema operado con más

enzima, aun cuando el GH sea menor. Siguen en orden de magnitud las fracciones de péptidos <10 kDa y luego las <3 kDa. Sin diferencias en las medias entre los niveles de enzima analizados. La porción de péptidos con tamaños comprendidos entre 3-10 kDa también tienen un considerable poder reductor de radicales ABTS+. Peng et al. (2009), obtuvieron resultados similares en hidrolizados de aislado de proteína de suero con Alcalasa. La fracción con péptidos en el rango de 0,1 a 2,8 kDa mostró una mayor actividad antioxidantes que las fracciones con péptidos de mayor tamaño (Peng et al., 2009).

Por otro lado, los resultados de los ensayos con FRAP sugieren que la fracción peptídica con tamaños entre 3-10 kDa son las que mayor actividad antioxidante exhiben. Las fracciones obtenidas con niveles altos de enzima superan en un 70% el poder de reducción del hierro férrico (Fe⁺³). Por su parte, los péptidos de pequeño tamaño (<1 kDa), obtenidos con el nivel intermedio de enzima, duplican esta capacidad con respecto a las fracciones obtenidas con mayor nivel de enzima (con mayor GH). Al respecto, Peña, et al. (2004) señalaron que, en los hidrolizados de proteína de suero, están presentes fracciones peptídicas que pueden llegar a ser tanto antioxidantes como pro-oxidantes, por lo que el efecto esperado como antioxidante se ve reducido por el efecto antagonista (Peña-Ramos et al., 2004).

3.3.6. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno de fracciones cromatográficas y ultrafiltrados de menor tamaño

El efecto de los niveles de enzima en la capacidad de absorción de radicales de oxígeno de hidrolizados enzimáticos de menor tamaño (<1kDa), se analizó en detalle a través de la separación cromatográfica por HPLC-RP. Muestras de estos hidrolizados, previamente desalados, se analizaron para comparar los perfiles de separación. En la Fig. (6C) se muestran los perfiles cromatográficos para hidrolizados totales (tiempo final), obtenidos con E₀ media y alta. El cromatograma se dividió en tres partes, de acuerdo con el tiempo de retención, que señala la hidrofobicidad de los péptidos constituyentes de estas fracciones. Se recuperaron muestras de estas tres fracciones, las cuales fueron concentradas eliminando el exceso de solventes de la fase móvil y reconstituyendo en agua destilada hasta una concentración de proteínas de 0,5 mg/mL. La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) se tomó como indicativo para comparar la capacidad antioxidante entre las dos muestras mencionadas.

Los cromatogramas muestran perfiles bastante similares, sobre todo en lo que se refiere a la F2, compuesta básicamente por péptidos con hidrofobicidad intermedia. En este caso, no existe diferencia significativa ($p < 0,005$) entre los valores de ORAC obtenidos con enzima media y alta. Es de anotar que la mayor contribución a la capacidad antioxidante de estas muestras, se debe precisamente a estas fracciones peptídicas intermedias.

Sin embargo, en la primera parte del cromatograma, que corresponde a la zona de elución de péptidos con poca hidrofobicidad. Se aprecian algunas diferencias importantes, relacionadas con las forma y tamaño de los picos característicos. Una menor porción de péptidos antioxidantes señalados en la F1 se obtiene cuando se opera el reactor con más enzima, hasta un GH=19,2% en comparación con los obtenidos en la otra condición. La F1 obtenida con una cantidad de enzima media y GH=16% tiene mayor capacidad antioxidante medido por ORAC, en comparación con la

obtenida con más enzima en la operación. En efecto, es probable que algunos péptidos, que se han formado con un GH=16% puedan ser hidrolizados mientras la reacción avanza hasta 19% de GH.

De otro lado, la fracción F3, compuesta por una porción peptídica más hidrofóbica, solo es importante en el ultrafiltrado obtenido con enzima intermedia (menor GH). Esta fracción muestra un potencial antioxidante similar al de la F1 y puede ser la responsable de las diferencias en las actividades, registradas en los hidrolizados ultrafiltrados menores de 1 kDa en las dos condiciones evaluadas.

Un cambio en los niveles de enzima, manteniendo constante el sustrato, significa una modificación en la relación enzima-sustrato. Cuanto mayor es la cantidad de enzima de acuerdo con el sustrato, es de esperar un aumento en la velocidad de formación de productos. Respecto al GH, con una determinada concentración de enzima constante, se espera que ocurra la escisión del mismo número de enlaces en función del tiempo, independientemente de la concentración de sustrato. Esto significa que, si la concentración de sustrato es la misma, es de esperar un mayor GH en la medida en que más enzima se use en una reacción. Sin embargo, esto no significa que se obtendrán péptidos con mayor capacidad antioxidante a los obtenidos con menor GH en otras condiciones de operación (menor cantidad de enzima). Pues algunos otros fenómenos asociados a la naturaleza de la reacción determinan los péptidos finales que se forman. Entre estos fenómenos se destacan: La selectividad de la enzima por el sustrato, las inhibiciones por productos y la desactivación térmica y posiblemente mecánica de la enzima.

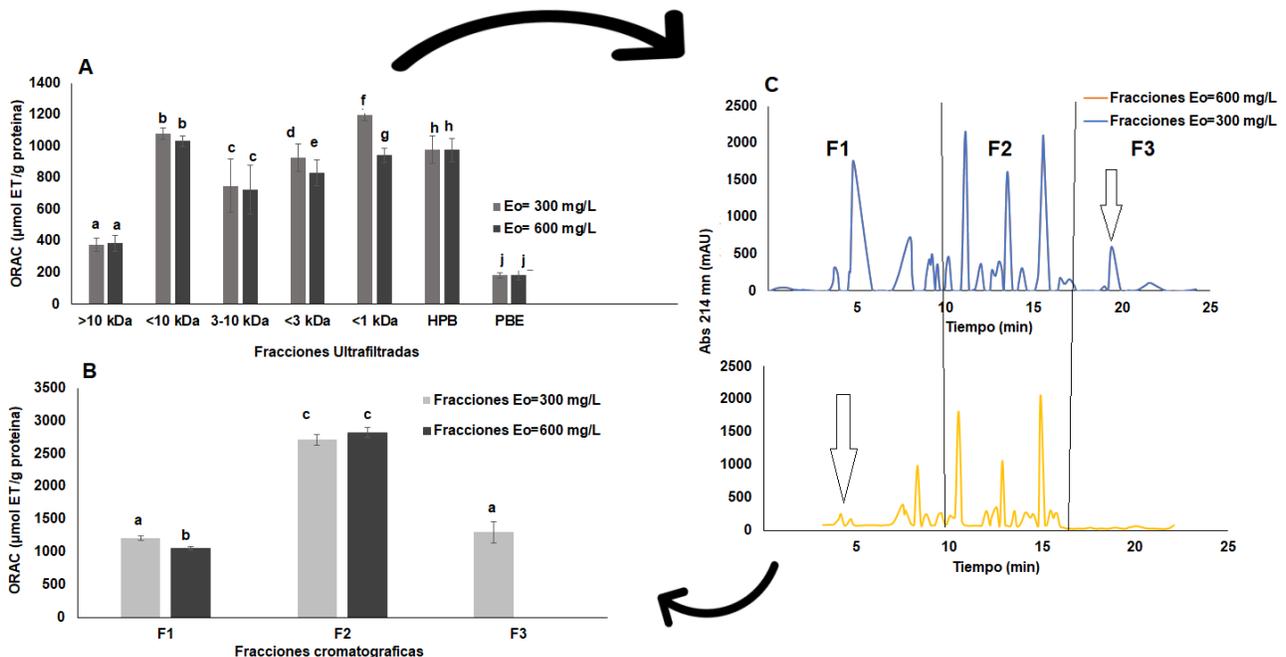


Fig. 3.6. Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC): A) Fracciones ultrafiltradas (>10, <10, 3-10, <3, <1 kDa), hidrolizado de plasma bovino (HPB) y plasma entero bovino (PEB) y B) Fracciones separadas por HPLC-RP (F1, F2 y F3). C) Perfil cromatográfico para hidrolizados desalados <1kDa obtenidos con niveles de enzima inicial media (300 mg/L) y alta (600 mg/L).

Como se ha evidenciado en numerosos trabajos de hidrólisis de proteínas, el GH aumenta con el tiempo y a su vez la capacidad antioxidante. Esta tendencia, en términos generales, se observó en los resultados obtenidos. Pese a esto, una mejor actividad antioxidante se registra con niveles de enzima intermedio. En efecto, esta mejora en la actividad con el GH es relativa y con similar tendencia en cada condición de hidrólisis, puesto que, la capacidad antioxidante de los hidrolizados enzimáticos depende en gran medida del peso molecular. Pero la secuencia de la cadena de aminoácidos en la estructura peptídica resultante es un elemento determinante en la exposición de la capacidad antioxidante (Chalamaiah et al., 2012). A juzgar por la forma del cromatograma, aunque no parece existir diferencias importantes en el perfil peptídico obtenido en estas dos condiciones de operación, las sutiles diferencias expuestas, parecen ser determinantes para la definición de la actividad antioxidante. Esto debido a que una comunidad de péptidos de distinta característica química se ha obtenido en el filtrado. En este caso, la presencia de un pico característico en la zona de alta hidrofobicidad, sugiere la presencia de péptidos que contienen residuos hidrofóbicos (His, Trp, Phe, Pro, Gly, Lys, Ile y Val), ampliamente relacionados en la literatura científica con la capacidad antioxidante (Zheng et al., 2016).

3.4. CONCLUSIONES

La actividad antioxidante de las fracciones peptídicas hidrolizadas en los dos experimentos (Exp A y B) es por lo menos el doble al de las proteínas originarias. Para todas las combinaciones de niveles S_0 (5, 10 y 20 g/L); E_0 (150, 300 y 600 mg/L) y actividades analizadas (FRAP Y ABTS), no parece existir una relación directa entre el GH y la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas. La exposición de actividad es producto de un efecto sinérgico de una gran variedad de péptidos distintos (de diferentes tamaños moleculares y característica química distinta), que aparecen y desaparecen en el tiempo, con cinéticas de producción diferentes.

El uso de una mayor cantidad de enzima (600 mg/mL) no necesariamente implica que se obtengan fracciones peptídicas con una mayor actividad, aunque sí significa un mayor GH (cerca al 20%). Una mayor actividad antioxidante (FRAP y ABTS) relativa se expresa en los hidrolizados cuando se utiliza una cantidad de enzima intermedia (300 mg/mL), aunque el GH final sea significativamente inferior al obtenido con más enzima para el mismo tiempo. Respecto a la concentración de sustrato se puede concluir que, a pesar de que, al hidrolizar, en un sistema cargado con una menor concentración de sustrato (5 g/L), es mayor la velocidad de escisión de enlaces, en realidad se obtienen mejores resultados de actividad antioxidante relativa cuando se opera el sistema con una carga de sustrato intermedio (10 g/L), la cual, coincide con el K_M del mismo.

Las actividades ABTS sugieren que la fracción con péptidos menores a 1 kDa tienen un efecto reductor de radicales libres sustancialmente alto, con diferencias significativas entre las fracciones obtenidas con niveles de enzima media y alta. Fracciones peptídicas de hidrofobicidad intermedia son las responsables de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de hidrolizados enzimáticos obtenidos tras la hidrólisis operada con distintas concentraciones de enzima (300 y 600 mg/mL). Menor proporción de péptidos de hidrofobicidad baja se obtiene cuando se opera el reactor con más enzima (600 mg/mL), hasta un GH=19,2%, en comparación con los obtenidos con menos enzima. La F1, rica en péptidos con péptidos de hidrofobicidad baja obtenidos con una cantidad de enzima media enzima y GH=16% tiene mayor capacidad antioxidante medido por ORAC, en comparación con la obtenida con más enzima en la operación.

REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins* (E. applied science Publishers (Ed.); 1st ed.).
- Bah, C. S. F., Carne, A., McConnell, M. A., Mros, S., & Bekhit, A. E.-D. A. (2016). Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. *Food Chemistry*, *202*, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.020>
- Butré, C. I., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2014). Determination of the influence of substrate concentration on enzyme selectivity using whey protein isolate and bacillus licheniformis protease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(42), 10230–10239. <https://doi.org/10.1021/jf503151f>
- Corpuz, H. M., Nakamura, S., & Katayama, S. (2022). Current Trends in Food-Derived Peptidic Antioxidants. *Antioxidants*, *11*(5). <https://doi.org/10.3390/antiox11050962>
- de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, *74*, 185–198. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.05.013>
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(3), 674–677. <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, *86*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.06.018>
- Duarte, R. T., Carvalho Simões, M. C., & Sgarbieri, V. C. (1999). Bovine Blood Components: Fractionation, Composition, and Nutritive Value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(1), 231–236. <https://doi.org/10.1021/jf9806255>
- Eckert, E., Bamdad, F., & Chen, L. (2014). Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chemistry*, *159*, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.061>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*(5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Fernández, A., Suárez, A., Zhu, Y., FitzGerald, R. J., & Riera, F. A. (2013). Membrane fractionation of a β -lactoglobulin tryptic digest: {Effect} of the {pH}. *Journal of Food Engineering*, *114*(1), 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.030>
- Gómez, L. J., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de alcalasa 2.4 L. *Informacion Tecnologica*, *24*(1), 33–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000100005>
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, *16*(9), 945–960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>
- Marshall, K. (2004). Therapeutical applications of whey protein. *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, *9*(2), 136–156. <http://europepmc.org/abstract/MED/15253675>

- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chemistry*, *194*, 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.122>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & L. Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Peña-Ramos, E. A., Xiong, Y. L., & Arteaga, G. E. (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(14), 1908–1918. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.1886>
- Peng, X., Xiong, Y. L., & Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, *113*(1), 196–201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.068>
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rutherford, S. M. (2010). Rutherford, S. M. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in nal of AOAC INTERNATIONALHydrolysates: A Review. *JourNAL*, *93*(5), 1515–1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of P. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *93*(5), 1515–1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>
- Sabeena Farvin, K. H., Andersen, L. L., Nielsen, H. H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., & Jessen, F. (2014). Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*, *149*, 326–334. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.03.075>
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M.-P., & Amar, R. Ben. (2014a). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: {Impact} on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, *65*, Part C, 453–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.026>
- Saidi, S., Deratani, A., Belleville, M. P., & Amar, R. Ben. (2014b). Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Research International*, *65*(PC), 453–461. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.04.026>
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, *25*(6), 1433–1440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.003>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, *31*(10),

1949–1956. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2010.06.020>

Tang, C.-H., Wang, X.-S., & Yang, X.-Q. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, *114*(4), 1484–1490. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.049>

Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., & Almonacid, S. (2015). Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, *50*(4), 589–597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028>

Walters, M. E., Esfandi, R., & Tsopmo, A. (2018). Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods*, *7*(10). <https://doi.org/10.3390/foods7100172>

Wang, J.-Z., ZHANG, H. A. O., ZHANG, M., YAO, W.-T., MAO, X.-Y., & REN, F.-Z. (2008). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of porcine plasma albumin and globulin. *Journal of Food Biochemistry*, *32*(6), 693–707. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2008.00185.x>

Wang, Z., Liu, X., Xie, H., Liu, Z., Rakariyatham, K., Yu, C., Shahidi, F., & Zhou, D. (2021). Antioxidant activity and functional properties of Alcalase-hydrolyzed scallop protein hydrolysate and its role in the inhibition of cytotoxicity in vitro. *Food Chemistry*, *344*, 128566. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.128566>

Winters, A. L., & Minchin, F. R. (2005). Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Analytical Biochemistry*, *346*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2005.07.041>

Zhang, W., Li, Y., Zhang, J., & Huang, G. (2016). Optimization of Hydrolysis Conditions for the Production of Iron-Binding Peptides from Scad (*Decapterus maruadsi*) Processing Byproducts. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *12*(4). <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2016.220.229>

Zheng, L., Zhao, Y., Dong, H., Su, G., & Zhao, M. (2016). Structure–activity relationship of antioxidant dipeptides: Dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues. *Journal of Functional Foods*, *21*, 485–496. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.003>

Zhu, K.-X., Wang, X.-P., & Guo, X.-N. (2015). Isolation and characterization of zinc-chelating peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, *12*, 23–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.030>

Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, *21*, 1 – 14. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85045189905&partnerID=40&md5=41fef4c003bd9ced261cdda7e935da17>

CAPÍTULO 4. INFLUENCIA DEL SUSTRATO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FRACCIONES PEPTÍDICAS CON POTENCIAL BIOACTIVO: PLASMA BOVINO-ALCALASA 2.4L

RESUMEN

Se han realizado muchos estudios probando diferentes combinaciones de enzimas y proteínas para producir péptidos con diferentes tipos y niveles de bioactividad; sin embargo, el efecto de la concentración de proteína en el reactor de hidrólisis sobre la secuencia y la bioactividad de los péptidos producidos, manteniendo constante la relación enzima-sustrato, es un tema poco estudiado. En este trabajo de investigación se hidrolizó plasma bovino mediante Alcalasa a varias concentraciones de sustrato (5, 10, 15 y 20 g/L) y a una relación enzima-sustrato fija de 1:25. Para cada concentración de sustrato, se evaluaron las propiedades antioxidantes y antihipertensivas *in vitro* de los hidrolizados producidos. Además, se analizaron la distribución de peso molecular de los péptidos y sus secuencias mediante SE-HPLC y RP-UPLC-MS/MS, respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos, los cambios en la concentración del sustrato generaron cambios en la selectividad de la enzima, produciéndose los péptidos más pequeños a las concentraciones más bajas de sustrato. Además, también se detectaron ligeras diferencias en la secuencia de péptidos entre los hidrolizados, lo que condujo a diferentes niveles de actividad antioxidante y antihipertensiva.

Palabras clave: Plasma Bovino; Alcalasa; Hidrólisis; Nivel de sustrato; antioxidante; Antihipertensivo

4.1. INTRODUCCIÓN

El análisis de bioactividad de péptidos derivados de la hidrólisis de proteínas alimentarias es un área de estudio con mucho potencial. Esto debido a la evidencia científica que relaciona el efecto positivo sobre la salud humana con la ingesta de algunos péptidos presentes en las cadenas proteicas (Hernández-Ledesma et al., 2011). La mayor parte de investigaciones en esta área, han estado enfocadas en identificar nuevas secuencias con fuentes proteicas y enzimas variadas. También, se ha trabajado en el análisis de condiciones de operación para la mejora de las propiedades biológicas *in vitro* (Seo et al., 2015). Se ha establecido la relación existente entre la actividad biológica de los péptidos y su peso molecular. Tecnologías de filtración por membrana, se han utilizado con relativo éxito para purificar péptidos con efectos bioactivos de hidrolizados de proteínas lácteas, soya y sustratos vegetales (de Castro & Sato, 2015).

En este contexto, cabe destacar que aproximadamente el 8% de la proteína derivada de la sangre bovina se encuentra en el plasma obtenido por fraccionamiento. Este, representa cerca del 60-70% del volume total de la sangre. Entre las principales proteínas del plasma bovino están: la albumina, las inmunoglobulinas, α - and β -globulinas, and fibrinogeno (Duarte et al., 1999). Estas proteínas tienen un significativo potencial bioactivo y sus hidrolizados son una fuente importante de péptidos antioxidantes y antihipertensivos (Hyun & Shin, 2000; Salgado et al., 2011).

La reacción de hidrólisis enzimática de proteínas es compleja, principalmente por: i) la naturaleza variada y muchas veces desconocida de los sustratos (estructuras primarias y terciarias de proteínas distintas), ii) la formación de nuevos sustratos de hidrólisis a medida que la reacción avanza, iii) liberación de péptidos cortos y aminoácidos que causan inhibiciones enzimáticas. iv) inactivación de la enzima en el tiempo (Valencia et al., 2015) y v) efectos asociados a la variada reactividad de los enlaces en relación con la enzima usada, así como la accesibilidad de esta a sitios específicos del sustrato (estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas) (Fernández & Riera, 2013). Si el objetivo es producir fracciones peptídicas de interés específico, es clave, reconocer que los fenómenos propios de la hidrólisis proteica afectan los productos y que este efecto se ve influenciado no solo por condiciones de operación ampliamente estudiadas como el pH y la temperatura de reacción, si no por los niveles de sustrato y enzima que se emplean en los reactores (Deng et al., 2018).

En el análisis del modelo clásico de Michaelis-Menten se deduce que no debería existir efecto alguno sobre la velocidad de hidrólisis de proteínas si se mantiene una relación E/S constante. Sin embargo, se ha encontrado que, en algunos sistemas de reacción, la tasa de hidrólisis tiende a ser menor a medida que aumenta la concentración de sustrato. Pero es claro que, la influencia de la concentración de sustrato sobre la máxima capacidad de hidrólisis parece no ser un fenómeno asociado exclusivamente al sustrato (Deng et al., 2018). Algunos aspectos relevantes en términos de productividad de las reacciones de hidrólisis enzimática de proteínas son: i) al aumentar la concentración de sustrato, se reduce el consumo de agua y energía del proceso ii) si no existe ningún efecto sobre la velocidad de la reacción cuando la relación E/S es constante, se deduce que es posible alcanzar mayor rendimiento en productos cuando el sustrato está más concentrado, iii) resulta particularmente complejo describir la cinética de la reacción a nivel molecular, esto por la ausencia de métodos prácticos de caracterización, iv) la operación de hidrólisis con sustratos iniciales distintos puede impactar el mecanismo de la hidrólisis (Butré, et al., 2014), lo que puede

significar formación de péptidos distintos en cada tiempo con expresiones de capacidad antioxidantes y antihipertensiva variada.

Han sido encontrados novedosos péptidos bioactivos por hidrólisis de proteínas plasmáticas de sangre de ganado utilizando diferentes enzimas, como papaína (Lafarga et al., 2016), proteasas vegetales y fúngicas (Bah et al., 2016), pepsina y tripsina (Aiemratchanee et al., 2021) y Alcalase (Hou et al., 2019). En este sentido, hay que destacar el uso de Alcalasa para este fin. Alcalase es un producto comercializado por Novozymes Corp y está formulado con un 50% (p/p) de glicerol, un 41% (p/p) de agua y un 9% (p/p) de extracto de proteasa de *Bacillus licheniformis*. Este extracto de proteasa es capaz de reconocer una amplia variedad de aminoácidos posicionados en P1 y P2' o P3', por lo que muestra una amplia especificidad y selectividad enzimática, siendo capaz de hidrolizar una gran variedad de sustratos proteicos y dando lugar a un hidrolizado con un alto contenido en péptidos pequeños (Tacias-Pascacio et al., 2020). Considerando que las secuencias de aminoácidos más pequeñas, con pesos moleculares entre 1 – 4 kDa, son las más interesantes para usos nutricionales y/o farmacéuticos (Saidi et al., 2014), el uso de Alcalase para producir péptidos bioactivos ha demostrado ser efectivo.

Alternativamente, la producción de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas se puede estudiar considerando no solo la enzima utilizada o la fuente de proteína, sino también variando las condiciones de hidrólisis. En este sentido y en los últimos tiempos, algunos autores han estudiado la producción de péptidos antioxidantes y antidiabéticos a partir de la caseína utilizando Protamex™, un producto comercial con actividad proteinasa de bacillus, y variando el pH, el tiempo de hidrólisis y la temperatura (Nongonierma et al., 2017). Por otra parte, Tu et al., (2018) probaron el efecto de varias relaciones enzima/sustrato y tiempos de hidrólisis sobre la bioactividad *in silico* de los péptidos obtenidos tras hidrolizar caseína con tripsina. Además, Ding et al., (2020) optimizaron la producción de péptidos antioxidantes a partir de proteína de guisante usando Alcalase y variando la proporción de enzima/sustrato, la temperatura y el pH.

Entre tanto, el efecto de variar la concentración inicial de sustrato manteniendo la relación enzima-sustrato sobre la producción de péptidos antioxidantes y antihipertensivos nunca ha sido estudiado para ninguna fuente de proteína y combinación de enzimas. En relación con la hidrólisis de plasma bovino con Alcalase, si el objetivo es producir fracciones peptídicas de interés específico utilizando tanto esta fuente de proteína barata como esta valiosa enzima, es clave entender cómo los fenómenos de hidrólisis de proteínas afectan la producción de estos péptidos y cómo este efecto está influenciado no solo por las condiciones de operación ya ampliamente estudiadas, como el pH y la temperatura de reacción, sino también por los niveles de sustrato cargado en el reactor (Deng et al., 2018).

Por tanto, el objetivo de este estudio fue, analizar la influencia de la concentración inicial de proteína, pero manteniendo fija la relación enzima-sustrato, tanto en el proceso de hidrólisis como en la producción de fracciones peptídicas con propiedades antioxidantes y antihipertensivas, utilizando plasma bovino y Alcalase. Para ello se estudió el grado de hidrólisis, el tamaño de los péptidos, las propiedades antioxidantes y la secuencia de los péptidos obtenidos para cada concentración de sustrato ensayada. Finalmente, se analizaron *in vitro* e *in silico* las potenciales propiedades antihipertensivas de los péptidos obtenidos. Al mismo tiempo, se intenta explicar los

fenómenos bioquímicos asociados a la ruptura de enlaces y la formación de péptidos de interés en las condiciones de reacción mencionada.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Preparación de muestras de proteínas

En el análisis se empleó plasma entero bovino obtenido por centrifugación de sangre fresca a 5.000 RPM por 10 min a 2°C, Seroalbúmina (BSA \geq 96%, Sigma-Aldrich) y Gammaglobulina bovina (γ -globulina 99%, Sigma-Aldrich). Una vez obtenido, el plasma fue almacenado a -18 °C para su utilización posterior. La concentración de proteínas en la fracción plasmática fue de 8,4 % determinada por el método de Lowry modificado (Winters & Minchin, 2005) empleando BSA como estándar. Una porción de muestra de plasma obtenido fue dializada utilizando membranas de diálisis de celulosa (D9402-100FT, Sigma-Aldrich) en agua destilada. En la diálisis, el agua fue periódicamente cambiada hasta registrar valores de conductividad electrolítica inferiores a 1 microsiemen (Hanna Instruments HI98129, USA). La concentración de proteína en el plasma dializado fue nuevamente valorada. BSA y γ -globulina fueron disueltas en agua destilada hasta una concentración de 20 g/L y almacenadas a 4°C para su utilización el mismo día.

4.2.2. Ensayos de Hidrólisis enzimática

La hidrólisis *in vitro* de las distintas muestras de proteína se hizo en reactores de 100 mL conectados a un sistema de ajuste automático de pH (pH-Buret 24 2s, Crison, España) y un agitador isotérmico. La temperatura y el pH se mantuvieron constantes en los valores óptimos de 60 ± 1 °C y 9, respectivamente. Para la hidrólisis se utilizó Alcalase 2.9 L (2,4 AU-A/g) grado alimentario (EC: 3.4.21.14, CALBIOCHEM, Canadá).

Las distintas muestras de proteína fueron diluidas en agua destilada hasta diferentes concentraciones de sustrato estudiadas (5, 10,15,20 g/L) e hidrolizadas utilizando una relación enzima sustrato (E: S) de 1:100 por 2.3 horas en el caso de BSA y γ -globulina, mientras que para plasma entero y dializado el tiempo de hidrólisis fue de 7 horas. La reacción se detuvo inactivando la enzima en un baño de calentamiento a 90 °C por 5 min.

En el monitoreo de la reacción se empleó el método pH-stat, reconocido como el más empleado en hidrólisis enzimática por su simplicidad (Rutherford, 2010). Se utilizó NaOH 1 N para mantener constante el pH. En principio, la base agregada para mantener constante el pH, neutraliza únicamente los protones liberados durante la ruptura del enlace amida de las proteínas a pH alcalino, que son sustituidos por el catión de la base; de este modo los protones generados por la hidrólisis son equivalentes a los moles de la base añadida (Adler-Nissen, 1986). La estimación del GH se hizo empleando la ecuación (4.1).

$$GH = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 = \frac{V_{NaOH} \times N_b}{M_p \times \alpha \times h_{tot}} \times 100 \quad (4.1)$$

Dónde: h = Número de enlaces peptídicos hidrolizados; H_{tot} = Número total de enlaces de péptidos en la proteína sustrato (eq/Kg); V_{NaOH} = Volumen de NaOH total (L), N_b = Normalidad de la base, M_p = masa de la proteína (en kg), GH = grado de hidrólisis.

El grado de disociación de los grupos α -NH₂ liberados en la reacción, α , se calcula directamente de la ecuación (4.2), y depende del pH de trabajo y del pK. Este último varía de forma significativa con la temperatura de reacción y puede estimarse de acuerdo con la ecuación (4.3). Se empleó un α calculado de 0,992 y un h_{tot} de 8,3 meq/g que ha sido reportado para proteínas de la sangre bovina (Adler-Nissen, 1986).

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK - pH}} \quad (4.2)$$

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400 \quad (4.3)$$

Dónde: α = Grado de disociación de la proteína y T = temperatura de trabajo en K.

4.2.3. Distribución de pesos moleculares por SE-HPLC e identificación de péptidos UHPLC y Q-TOF-MS

Se realizó un análisis cuantitativo de la distribución de pesos moleculares en los hidrolizados de plasma dializado mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño. Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución (Agilent 1200, Agilent Technologies Inc., California, EE. UU.), equipado con un detector UV de matriz de diodos operando a 214 nm y a temperatura ambiente. Todas las muestras se filtraron a través de Filtros de PVDF (Millipore) de 0,45 μ m antes de la inyección (20 mL) en una columna Yarra SEC- 2000 (300 x 7,8 mm). Se empleó como fase móvil Agua y Acetonitrilo en proporción 90/10 (v/v) con 0,03% de TFA (v/v), las muestras fueron eluidas con un flujo constante de 1 mL/min.

La columna se calibró previamente, empleando proteínas de diferentes tamaños como estándar: Ribonucleasa A (13,7 kDa), Albúmina (44,3 kDa), Tioglobulina (670 kDa) y tri-glicina (0,225 kDa), así como un marcador de bajo peso molecular, Glicina (0,075 kDa). La curva de calibración resultante mostró un coeficiente de determinación (R^2) de 0.96. Para analizar la distribución de pesos moleculares de los hidrolizados en el tiempo de reacción, se dividió el cronograma en tres regiones características de tamaños de acuerdo con el tiempo de elución y la curva de calibración. Estas fracciones se denominaron: Fracción de gran tamaño ($PM > 14$ kDa, compuesto principalmente por proteínas intactas), fracción de tamaño medio ($14 < PM < 3$ kDa) y fracción de menor tamaño ($PM < 3$ kDa, compuestos de interés bioactivo). Se estableció como límite el tiempo de retención correspondiente al área final del volumen total de la columna (11,8 min). No se registraron picos con un tiempo de retención superior al relacionado con el volumen total de la columna, lo cual implica pocas interacciones hidrofóbicas de la muestra con el material de la columna. Para una aproximación adecuada y simple, la distribución de tamaño de los hidrolizados se representó con el porcentaje de área para cada fracción calculado en relación con el área total del análisis, empleando el Software del dispositivo UHPLC.

La identificación de los péptidos presentes en ultrafiltrados menores de 3 kDa de cada fracción hidrolizada, se hizo por cromatografía líquida de alta presión con acople a espectrometría de masas en tándem (RP-UPLC-MS/MS) con un Dionex Ultimate 3000 RS UHPLC (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) conectado en línea a un Bruker Impact II Q-ToF mass spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA). Previo al análisis, 200 μ L de la muestra inicial fueron desaladas en columnas Millipore ZipTip C18. Se recuperaron 5 μ L que se llevaron a un volumen final de 25 μ L para el análisis.

Se empleó una columna Bruker Intensity Trio C18 (50 \times 2,1 mm, 3 μ m). El solvente “A” estuvo compuesto por agua ultrapura MilliQ y ácido fórmico 0.1% (v/v). El disolvente “B” estaba compuesto por acetonitrilo y ácido fórmico al 0,1 % (v/v), empleado en un gradiente de 2% durante 1 min, seguido de un aumento del 2% al 35% durante un período de 30 min, del 35% durante 1 min, del 35% al 80% durante 4 min, y finalmente 80% de B durante 1 min. El volumen de inyección fue de 2 μ L con un caudal de 150 μ L/min. La separación se realizó a 30 °C y los espectros de masas se obtuvieron en el modo de iones positivos, m/z. Se utilizó nitrógeno como gas de secado a una velocidad de flujo de 6,0 L/min y a 300 °C, y como gas nebulizador a una presión de 0,31 MPa. El voltaje capilar se ajustó a 4500 V y solo se consideraron para el análisis los picos con una intensidad superior al 10% del pico más intenso. El software PEAKS™ (Studio de Bioinformatics Solutions) se utilizó para identificar las masas peptídicas obtenidas después del análisis LC-MS/MS. En este caso, el límite de tolerancia de masa fue de 0,3 Da y la extensión peptídica mínima considerada fue de tres aminoácidos.

4.2.4. Potencial bioactivo de hidrolizados de plasma dializado

Se determinó la actividad biológica de fracciones de retenido y permeado resultante de la ultrafiltración de hidrolizados de plasma bovino dializado con diferentes concentraciones de proteína inicial (5,10,15,20 g/L). Para la filtración se usaron tubos de centrifugación Macrosep Advance (tamaño de corte <3 kDa). Luego de alcanzar el GH máximo de aproximadamente 19% para todas las muestras, la reacción se detuvo a 90 °C por 10 min para la desactivación enzimática. Las muestras fueron almacenadas -20 °C para su uso en los análisis in-vitro de las actividades biológicas.

4.2.4.1. Determinación de actividad antioxidante por ABTS

Se realizó siguiendo el método descrito por Re et al. (1999), en el cual 100 μ L de la muestra o estándar Trolox, se mezclaron con 1000 μ L de la solución ABTS. Luego se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. La absorbancia se registró a 730nm en un espectrofotómetro UV-Vis Genesys™ 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE.UU.), empleando solución de Trolox de concentraciones 0- 200 μ M como patrón (Re et al., 1999). Los resultados se expresaron como micromol de equivalentes Trolox por gramo de proteína (μ mol ET/g).

4.2.4.2. Determinación de actividad antioxidante FRAP

Se determinó por la metodología descrita por Pulido et al. (2000), 900 μ L del reactivo FRAP (con TPTZ, FeCl₃ y tampón acetato 3 M), se mezclaron con 90 μ L de agua destilada y 30 μ L de la muestra o estándar Trolox y se incubaron a 37 °C en un baño seco por 30 min. Se midió el

incremento en la absorbancia a 595 nm, empleando un espectrofotómetro Genesys™ 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE.UU.), contra un blanco de buffer acetato de sodio. Se empleó una solución de Trolox de concentraciones 0-300 μM como patrón (Pulido et al., 2000). Los resultados se expresan como micromol de equivalentes Trolox por gramo de proteína ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína).

4.2.4.3. Determinación de actividad antioxidante ORAC (Oxygen radical absorbance capacity)

El método mide el efecto estabilizador de los radicales libres sobre los compuestos antioxidantes mediante el mecanismo de donación de un átomo de hidrógeno. Se empleó la metodología descrita por Ou et al. (2001). Se mezclaron 150 μL de fluoresceína 1 μM (sustrato fluorescente) y 25 μL de muestra (diluidos en buffer fosfato 10 μM a pH 7,4 hasta una concentración de proteínas de 0,2 mg/mL). La mezcla fue preincubada por 30 min a 37° C. Luego 25 μL de una solución de 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) 250 mM fue adicionada. La intensidad de la fluorescencia fue medida con longitudes de onda de excitación y emisiones fijas de 485 y 520 nm, respectivamente (Ou et al., 2001).

4.2.4.4. Determinación de actividad inhibidora de la ACE

La ACEI fue determinada utilizando el método espectrofotométrico propuesto por Cushman y Cheung (1971) (Cushman & Cheung, 1971), con algunas modificaciones. 100 μL de solución de HLL (5 mM) en metaborato de sodio tetrahidratado (100 mM) y NaCl (300 mM) a pH= 8.3 se adicionaron a 40 μL de muestra y 20 μL ACE en una concentración de 0.1 U mL⁻¹. Agua milli-Q fue empleada como blanco. La reacción se incubó por 30 min a 37 °C y posteriormente se detuvo agregando 250 μL de HCL 1M. Se agregó 1 mL de acetato de etilo y centrifugación durante 10 min a 1500 x g y 25 °C, para extraer el ácido hipúrico liberado. Posteriormente se elimina el acetato de etilo del sobrenadante con calentamiento a 75°C por 20 min. La absorbancia del residuo de ácido hipúrico se midió a $\lambda = 228$ nm en un espectrofotómetro Genesys™ 10S UV-Vis (Thermo Scientific, EE.UU.). El porcentaje de inhibición de ACE se calculó como: la diferencia de la absorbancia del AH formado después la acción de la ACE sin inhibidor y la absorbancia en presencia el inhibidor, sobre la diferencia entre la absorbancia del AH formado después la acción de la ACE sin inhibidor y absorbancia del HHL que no ha reaccionado y ha sido extraído con acetato de etilo. El IC₅₀ fue determinado por regresión lineal ensayando concentraciones peptídicas de 0.2-1.0 mg/mL.

4.2.5. Análisis estadísticos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos se muestran con sus respectivas desviaciones estándares. Un ANOVA simple sirvió para analizar el impacto de los niveles de sustrato sobre el GH para diferentes proteínas. El análisis de múltiples rangos se hizo con la diferencia mínima significativas (LSD) Estos análisis se realizaron utilizando el software estadístico Statgraphics V.15.2.06.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. El efecto de los niveles de sustrato en el GH_{max} de proteínas de plasma bovino y sus fracciones proteicas mayoritarias

En el análisis de los sistemas de reacción para la producción de péptidos bioactivos de hidrólisis enzimática de proteínas, es importante considerar los criterios de productividad. Teniendo en cuenta los efectos de las condiciones de operaciones, sobre la cinética de producción de compuestos de interés. La actividad Biológica de hidrolizados enzimáticos de proteínas se relaciona con el peso molecular de los péptidos, así como con la estructura de la cadena de aminoácidos resultante en los péptidos luego de la escisión (Chalamaiah et al., 2012). En muchos casos el GH, resulta ser una herramienta indirecta para describir la distribución del peso molecular de los hidrolizados. Una prolongada hidrólisis redundante casi siempre en grados de hidrólisis altos y por tanto en tamaños peptídicos mucho más pequeños (Morales-Medina et al., 2016). A pesar de que las enzimas tienen cierta especificidad. En la práctica, la escisión por hidrólisis, está fuertemente condicionada por numerosos aspectos. Entre los cuales se cuenta concentración de sustrato inicial. Se ha demostrado que el nivel de sustrato empleado influye, tanto la dinámica de ruptura, como el GH máximo alcanzado y por supuesto los péptidos finales obtenidos.

Las curvas de hidrólisis (GH Vs tiempo) con Alcalasa 2.9 L, empleando una relación E:S=1:25 con distintas concentraciones de sustrato inicial para plasma entero sin dializar y dializado, se muestran en la (Fig. 4.1A y 4.1B). En ninguno de los casos se evidenció formación de gel que sugiera procesos de agregación proteica importante. La solubilidad de los sustratos es de aproximadamente $97\% \pm 4.2\%$ (datos no mostrados). En el caso de la hidrólisis de plasma entero bovino sin dializar, se encontró que el GH_{max} decrece con la concentración de sustrato (Fig. 4.1A). Existiendo diferencias medias significativas ($p < 0,05$) entre los GH_{max} s alcanzados con niveles de concentración de sustrato elevados (15 y 20 g/L) y el nivel más bajo evaluado en este estudio (5 g/L). Entre tanto, no se registra diferencia entre el GH_{max} alcanzado con los niveles bajos (5 y 10 g/L), así como entre los más altos (15 y 20 g/L). Para este caso, un cambio de 10 unidades de concentración genera un efecto significativo en el GH_{max} .

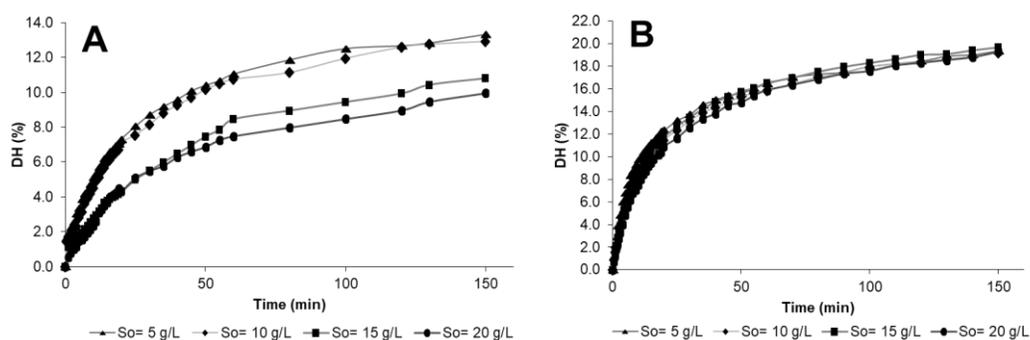


Fig. 4. 1. Curva de hidrólisis (DH Vs time) hidrolizados de plasma entero sin diálisis (A) y plasma bovino dializado (B). Usando Alcalasa 2.9 L con diferentes concentraciones de proteínas ($S_0=5,10,15,20$ g/L) y una relación enzima-sustrato de 1:25

Existen razones para afirmar que, cambios en la concentración de sustrato inicial en la hidrólisis, pueden generar cambios en la composición de los hidrolizados en el tiempo (Deng et al., 2018).

Estos cambios, debido a la selectividad de la enzima, sugieren la aparición de péptidos de característica química distinta que podrían inhibir la proteasa y en este sentido influenciar, tanto la velocidad de hidrólisis como los mecanismos de reacción (Butré, Wierenga, et al., 2014) y por tanto el GH_{max} . La velocidad de las reacciones enzimáticas se ve influenciada por la fuerza iónica del medio, esta interfiere en los mecanismos de interacción proteína- proteína y en la estabilidad térmica de las mismas (Butré et al., 2012). Existe evidencia de aumentos lineales de la conductividad de disoluciones proteicas con concentraciones de sustrato inferiores a 10 % (p/V) (Creusot et al., 2011) y aunque es claro que la conductividad afecta la hidrólisis, no han sido explicados los mecanismos por los cuales esto ocurre (Butré et al., 2012). Por otra parte, se conoce que un ion tiene, tanto la capacidad para competir con la enzima por las moléculas de agua cercanas, como para interactuar con la enzima desde su posición dentro de una capa de agua (M. Broering & S. Bommarius, 2005).

Puesto que la reacción se llevó a cabo con plasma entero bovino que contiene aproximadamente 0.1% de compuestos inorgánicos, entre ellos sales de calcio, sodio y magnesio (Duarte et al., 1999). En un segundo ensayo el plasma fue dializado y posteriormente hidrolizado, encontrando que, en contraste con los resultados anteriores, no hay diferencias significativas ($p < 0,05$), entre los GH_{max} alcanzado con las distintas concentraciones de sustrato inicial a una E:S fija. Los resultados demuestran que los componentes removidos por diálisis tienen un efecto importante, tanto sobre la velocidad de hidrólisis (a juzgar por la forma de la curva), como en el GH_{max} alcanzado (Fig. 4.1).

La influencia de la concentración de sustrato sobre el GH_{max} no es exclusiva de un sustrato. En el plasma confluyen muchas proteínas con patrones de interacción variado y complejo. Alrededor del 72% de la proteína total del plasma corresponde a BSA (41%) y γ -globulina (31%). Un nuevo experimento se propone para analizar el patrón de hidrólisis de estas fracciones proteicas mayoritarias, como herramienta para identificar elementos conceptuales del patrón de ruptura de una enzima en matrices con muchas proteínas, como el plasma bovino. Para esto se empleó BSA γ -Globulina bovina comercial.

Los resultados de la hidrólisis de BSA (ver Fig. 4.2A) muestran un comportamiento contrario al registrado con plasma entero sin dializar. El GH_{max} alcanzado es proporcional a la concentración de sustrato inicial empleado en el reactor, sin diferencias ($p < 0,05$) entre los niveles más altos (15 y 20 g/L) de sustrato analizados.

Según el análisis in-silico, el GH_{max} teórico que se puede alcanzar en la hidrólisis de BSA y la enzima empleada es de 27.79%. Este dato representa la relación entre los posibles sitios de escisión de BSA y el total de enlaces de la cadena reportados en la secuencia de aminoácidos de BSA (UniProt ID: ALBU_BOVIN|UniProt AC: P02769) según la base de datos UniProt: <http://www.uniprot.org/>. Empleando la opción "Enzyme(s) action" de BIOPEP disponible en: <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>, seleccionando la enzima Subtilisina (EC 3.4.21.62).

Los resultados muestran que un GH_{max} experimental, de aproximadamente 10%, se alcanzó con el nivel más alto de S_0 . Puesto que la Subtilisina es una enzima con afinidad por un gran número de residuos de aminoácidos el porcentaje real de escisión de enlaces es relativamente bajo. Solo la tercera parte de los enlaces susceptibles de hidrólisis fueron escindidos. Además, BSA es una

proteína globular con una configuración proteica que dificulta la dinámica de escisión, puesto que reduce la accesibilidad de la enzima a los sitios de unión (Adjonu et al., 2013). Esta accesibilidad que se ve comprometida con la existencia de 17 puentes disulfuros no hidrolizables por proteasas (Caprioli et al., 2012).

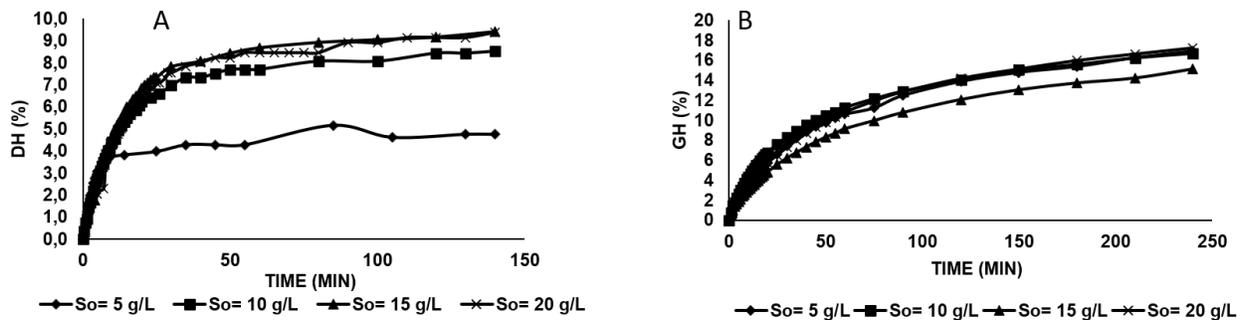


Fig. 4.2. Curva de hidrólisis (DH Vs tiempo) de fracciones proteicas mayoritarias del plasma bovino: BSA (A) y γ -Globulinas (B). Empleando Alcalasa 2.9 L con diferentes concentraciones de sustrato inicial ($S_0=5,10,15,20$ g/L)

Cuando se hidroliza γ -globulinas (ver Fig. 4.2B) con Alcalasa 2.9 L, la curva de hidrólisis es similar a la obtenida con plasma entero dializado. No existe diferencias en los GH_{max} alcanzado, para los distintos niveles de sustrato inicial evaluados. La γ -globulinas es una fracción compuesta principalmente de Inmunoglobulinas G y M, con un gran número de proteínas en proporciones variadas. En un análisis de MS de esta fracción del plasma bovino, se han identificado por lo menos 37 proteínas. Entre las principales se encontraron: C3 (Q2UVX4|CO3_BOVIN), apolipoprotein A-II (P81644|APOA2_BOVIN), serotransferrin (Q29443|TRFE_BOVIN), and prothrombin (P00735|THRB_BOVIN) (Lafarga, Wilm, et al., 2016). Solo para las dos primeras, consideradas las proteínas cuantitativamente más importantes en el sistema de complementos y el HDL respectivamente, el análisis in silico muestra un potencial de hidrólisis teórico del orden del 15% seleccionando la enzima Subtilisina (EC 3.4.21.62) en la función de corte. A juzgar por los resultados experimentales (ver Fig. 4.2B) un GH_{max} de aproximadamente 16% se alcanzó con todos los niveles de S_0 empleado en los experimentos. Pese a que es común que algo de BSA persista en las fracciones de γ -globulina obtenidas por precipitación hidroalcohólica en frío (Moure, Rendueles, & Diaz, 2003). Por ejemplo, el Componente C3 es una proteína de 190 kDa activada por proteólisis, con una cadena β N-terminal de 75 kDa conectada mediante un solo puente disulfuro a la cadena α C terminal de 115 kDa y estructura molecular curvada pero alargada con espacios entre dominios (Fredslund et al., 2006). Esto puede sugerir mayor accesibilidad relativa a sitios de corte potencial en comparación con la cadena de BSA.

Las diferencias en el patrón real de ruptura para las fracciones mayoritarias del plasma bovino indican que, puede existir una relación entre la tasa de escisión y el remanente de proteína intacta. Este remanente de proteína puede determinar el GH_{max} ya sea por efectos relacionados con especificidad o por la liberación de inhibidores enzimáticos.

4.3.2 Potencial de producción de fracciones peptídicas de plasma entero bovino dializado

En la práctica, la dinámica de escisión de una proteína está fuertemente influenciada por las condiciones de operación del reactor (pH, T, E/S, Fuerza iónica). Según el modelo de Linderstrom-Lang, para el caso de las reacciones de hidrólisis de proteínas globulares, se describen dos posibles mecanismos de reacción: one by one (uno a uno) y zipper (cremallera) (Deng et al., 2018). En el primero, la afinidad de la enzima por la proteína intacta es sustancialmente menor que la afinidad por las fracciones intermedias. En el segundo, las moléculas de proteína nativa se convierten con rapidez en productos intermedios que lentamente se hidrolizan en péptidos más pequeños (Adler-Nissen, 1986), productos de interés para este estudio.

En el plasma bovino se han identificado cerca de 500 proteínas (Henning et al., 2014). De estas, como en el plasma humano, solo unas pocas representan la mayor porción de proteínas en la matriz (Tirumalai et al., 2003) y las restantes están presentes en concentraciones relativamente bajas, lo que implica su presencia en amplios rangos de magnitud del orden de unas 10 veces (M. Broering & S. Bommarius, 2005). Esta variación en el rango de concentración no solo dificulta procesos de identificación de proteínas, sino que también, dificulta establecer relaciones cuantitativas efectivas entre las proteínas hidrolizadas y la cantidad de péptidos formados en el tiempo de reacción para un reactor. Sin embargo, es posible realizar un análisis de la tendencia a la formación de fracciones peptídicas de bajo peso molecular de acuerdo con la carga de proteína del reactor (concentración de sustrato inicial). Para esto, se analizó la distribución de tamaños moleculares de las distintas fracciones a medida que la reacción de hidrólisis avanza, dividiendo las fracciones en tres grupos.

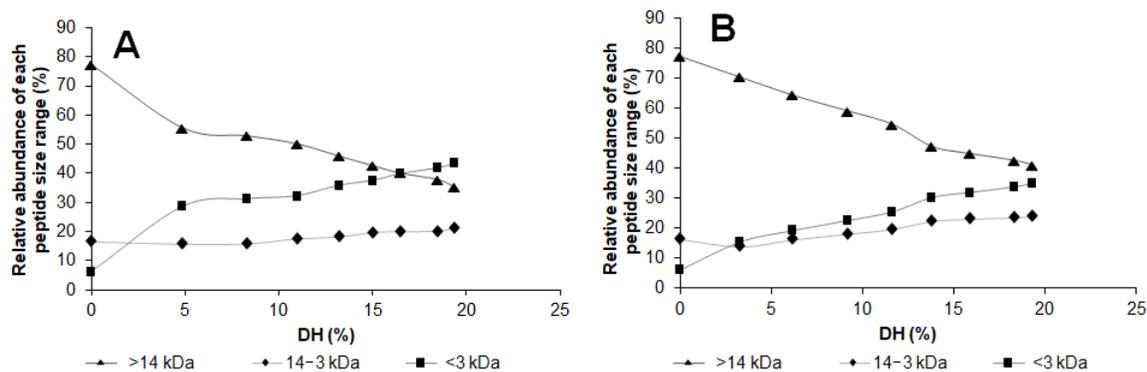


Fig. 4.3. Distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino dializado con Alcalasa 2.9 L. Hidrolizados obtenidos con $S_0=5$ g/L (A) y 20 g/L (B).

En la Fig. 4.3. se muestra la variación del porcentaje relativo de fracciones con tamaños moleculares altos, medios y bajos de acuerdo con GH experimental en un sistema de reacción con cargas baja y elevada. Las concentraciones de proteína inicial bajas de 5 g/L (Fig. 4.3A) y relativamente altas de 20 g/L (Fig. 3B) son analizadas. Una mayor velocidad de escisión de las fracciones de gran tamaño, compensada con una proporcional aparición de fracciones de tamaño mediano, se evidencia cuando el sustrato inicial es menor.

Con cerca del 5% de GH, casi el 30% de la proteína de mayor tamaño se ha fragmentado en el reactor con baja carga de sustrato. Mientras la mitad de esta, se ha roto cuando la carga del reactor es mayor (20 g/L). Esto implica, mayor eficiencia en ruptura de proteínas intactas cuando el sistema está relativamente alejando de las concentraciones de saturación en un reactor Batch.

Según los resultados de la Fig. 4.3, no parece existir diferencia entre los mecanismos cinéticos implícitos en la ruptura de enlaces de acuerdo con los niveles de sustrato en el sistema de reacción. Es claro que, aunque existe una mayor velocidad de ruptura de fracciones de gran tamaño en sistemas menos cargados, para el final del experimento, cuando el GH es de 19%, en los dos casos, aún persiste una proporción importante de fracciones con $PM > 14$ kDa. En ambas condiciones, la desaparición de fracciones de gran tamaño es consistente con la aparición de fracciones de menor tamaño y un aumento poco marcado de fracciones intermedias. De acuerdo con la teoría de Linderstrom-Lang, para un GH dado, la porción de proteína intacta debe ser menor para una reacción que sigue el mecanismo one-by-one que en uno que sigue el mecanismo Zipper (Deng et al., 2018). Considerando que una proporción alta de fracciones de gran tamaño es consistente con la presencia de gran cantidad de proteína intacta, en la práctica, el sistema de reacción Plasma bovino-Alcalasa 2.9 L, presenta una combinación de mecanismos como bien lo sugiere Adler-Nissen (1986), para un sistema típico. Sin embargo, la marcada aparición de fracciones de menor PM, en sistemas con baja carga de sustrato comparados con la de carga mayor, indica una tendencia a favorecer el mecanismo zipper en estas condiciones de reacción.

En el hidrolizado con un GH de 19%, se tiene el 43% de fracciones peptídicas con PM inferior a 3 kDa, cuando la carga inicial del reactor es de 5 g/L. Bastante superior al 35% logrado cuando el sustrato en el reactor fue de 20 g/L. Esta diferencia se relaciona con un remanente de fracciones de alto PM, ligeramente superior, en el reactor con más carga de sustrato inicial. Mientras que la concentración de compuestos intermedios permanece técnicamente constante, debido a que la velocidad de descomposición es similar a la de aparición (Fig.4.3).

En realidad, la enzima presenta cierta especificidad, entendida como el sitio en la cadena proteica en el cual la enzima puede actuar. En el caso de las proteínas, se refiere al aminoácido después del cual es posible escindir el polímero. Esta ruptura ocurre con más o menos velocidad de acuerdo con algunas condiciones del sistema y en ella juegan un papel importante la presencia de aminoácidos vecinos (Fernández & Riera, 2013). Butré, Sforza, et al., (2014) proponen el término “selectividad” para referirse a la velocidad relativa de escisión cercano a un tipo de aminoácido en una posición en la cadena, en relación con velocidad total de ruptura cercana al mismo aminoácido en las diferentes posiciones de la cadena proteica, es decir una expresión cuantitativa de la reactividad de los enlaces. Los resultados del experimento indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las concentraciones relativas de fracciones peptídicas de tamaño pequeño (compuestos de interés bioactivo) de acuerdo con la carga inicial de sustrato en el reactor, para reacciones con valores de GH similares. Esto puede significar cambios en la reactividad asociados con la cantidad de sustrato en el sistema.

Para probar la hipótesis de que el conjunto de péptidos generados en la hidrólisis de una proteína con un GH similar y distintos niveles de sustrato, es diferente. Se identificaron las poblaciones de péptidos en las fracciones ultrafiltradas menores a 3kDa, obtenidas con distintos niveles de sustrato a 19% de GH_{exp} . Los resultados indican que, con algunas excepciones, estas fracciones están compuestas de poblaciones de péptidos diferentes. La Fig. 4.4 muestra una caracterización relativa de cada fracción atendiendo al tamaño medio de los péptidos identificados. En general, las fracciones obtenidas con una carga de sustrato inicial superior a 15 g/L, contiene una menor proporción de péptidos pequeños (de menos de 9 residuos aproximadamente) y una mayor proporción de péptidos de más alto peso (más de 14 residuos aproximadamente), en comparación

con las fracciones obtenidas con menos sustrato. Este resultado es consistente con el análisis de la distribución de pesos moleculares por SE-HPLC (ver Fig. 4.3).

Estos datos refuerzan la idea de que la comprensión de los fenómenos asociados a la hidrólisis de proteínas implica analizar aspectos como: la disponibilidad física del sitio activo de la enzima a los enlaces con especificidad química conocida, el papel de las cadenas laterales de los aminoácidos cercanos a esos sitios de unión (aquí influyen aspectos como la carga definida por el pH y la presencia de sales en el medio de hidrólisis). Estos aspectos, influyen la selectividad media de la enzima y por tanto su disposición para escindir con mayor o menor velocidad ciertos enlaces de la cadena. Lo anterior significa que, no todas las uniones de aminoácidos son igualmente susceptibles al ataque de la enzima en una cadena proteica (Trusek-Holownia & Noworyta, 2015), lo que sin duda influye en la probabilidad asociada a la aparición de fragmentos peptídicos característicos. En la práctica, este asunto representa la principal limitación para la producción de péptidos con características específicas.

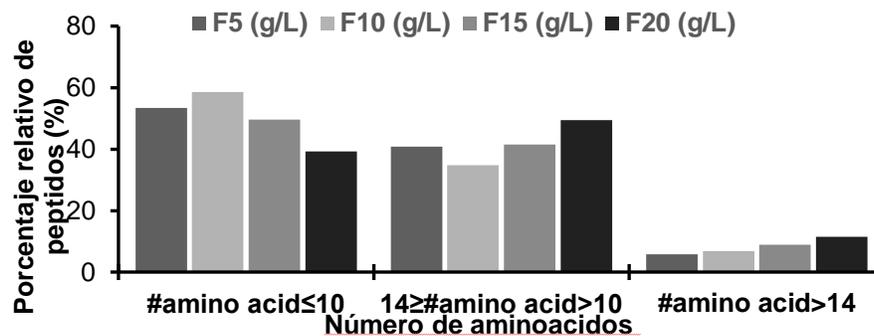


Fig. 4.4. Abundancia relativa de péptidos encontrados en el permeado de los hidrolizados ultrafiltrados (MWCO 3,0 kDa) considerando su tamaño. F5 es el permeado obtenido cuando la concentración inicial de proteína en el reactor fue 5 g/L; F10: 10 g/L; F15: 15 g/L y F20: 20 g/L.

4.3.3. Efecto de la concentración del sustrato sobre la actividad antioxidante

Se sabe de las reacciones de hidrólisis enzimática de proteínas que la actividad antioxidante *in vitro* suele aumentar en la medida que la hidrólisis avanza en el tiempo, con muchas diferencias en resultados numéricos registrados por las técnicas FRAP, ABTS y ORAC. La capacidad antioxidante de hidrolizados enzimáticos se relaciona fuertemente con el peso molecular, así como la estructura secundaria y primaria de las fracciones peptídicas resultantes (Chalamaiah et al., 2012). Por tanto, la medición del GH puede ser entendida como una estimación indirecta de la distribución del peso molecular de los hidrolizados, puesto que una hidrólisis prolongada implica GHs más elevados y tamaños de péptidos más cortos (Morales-Medina et al., 2016). Sin embargo, los resultados de la identificación de péptidos para reacciones con distintas concentraciones de sustrato inicial y similar proporción de enzima, demuestran que, existe una comunidad de péptidos diferentes con variada proporción relativa en cada muestra.

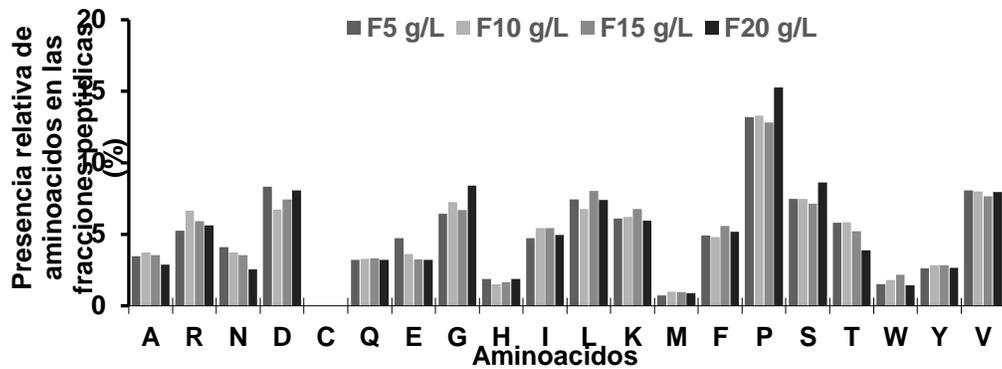


Fig. 4. 5. Composición de aminoácidos de los péptidos encontrados en los permeados (MWCO 3,0 kDa) obtenidos a partir de los hidrolizados de plasma bovino-Alcalasa (DH= 19%) con $S_0= 5,10,15$ y 20 g/L (F5, F10, F15 and F20 respectivamente).

En la Fig. 4.5 se muestra la composición relativa de aminoácidos presentes en cada fracción ultrafiltrada menor de 3 kDa (fracciones en las cuales se ha identificado importante actividad antioxidante) obtenida de hidrolizados de plasma bovino-Alcalasa con GH=19% a las diferentes concentraciones de sustrato inicial analizadas (F5-20 g/L de proteína).

Este resultado demuestra que, puede existir diferencias importantes en el perfil de los aminoácidos de péptidos de fracciones proteicas hidrolizadas, obtenidos con GHs similares en distintas condiciones de reacción. Se ha encontrado que, en los hidrolizados de Lactosuero bovino obtenidos con una carga proteica inicial menor, persiste en el tiempo menos proteína intacta que en los hidrolizados producidos con mayor carga de sustrato inicial. Esto es debido a que, en realidad, la afinidad de la enzima hacia la proteína está determinada por el equilibrio entre la proteína nativa y la desplegada en solución (Deng et al., 2018). La alteración de este equilibrio, implica una modificación en los mecanismos cinéticos implícitos en la hidrólisis, asociados a la variación en la composición de estos hidrolizados por cambios en la selectividad de la enzima a distintas condiciones de operación (Butré et al., 2012).

En general, en los HBP no filtrados y las fracciones ultrafiltradas existe una tendencia a aumentar la actividad antioxidante a medida que se registran aumentos en la carga inicial de sustrato en el reactor, con excepción de los resultados de la técnica FRAP para las fracciones peptídicas ultrafiltradas.

En los valores de actividad antioxidante medidos por ABTS, se nota un aumento de la actividad de por lo menos un 40% entre los HBP no filtrados de mayor y menor carga de sustrato (HBP5 Y HBP20) y un 20% para las mismas fracciones ultrafiltradas. En cuanto a los valores reportados para FRAP, las variaciones son significativas entre los hidrolizados obtenidos a 20 g/L y los obtenidos con baja carga relativa 5 y 10 g/L. Por otra parte, los resultados para la técnica ORAC, solo difieren significativamente en las fracciones sin filtrar procedentes de hidrolizados con 10 g/L, la muestra que en la identificación presenta la mayor cantidad de péptidos con un total de 501 péptidos identificados. En las fracciones ultrafiltradas, se evidencia una mayor capacidad para captar radicales de oxígeno en las fracciones peptídicas producidas con mayor carga inicial de sustrato, en este caso UF20<3kDa. En lo que respecta a actividad antioxidante in -vitro medida por

la técnica FRAP, se evidencia una sutil mejora de la actividad para las fracciones analizadas, en la medida en que el sistema de reacción opera con mayor carga relativa. Se nota por supuesto, las grandes diferencias en los moles de equivalente trolox registrados por las técnicas FRAP comparado con la técnica ABTS, en tanto, es conocido que las fuentes alimenticias sean menos propensas a la reducción del ion Fe^{3+} , que a captar radicales ABTS y peroxilo (Gómez et al., 2013).

Tabla 4.1. Actividad antioxidante *in vitro* (ABTS, FRAP Y ORAC) de hidrolizados enzimáticos enteros de Plasma Bovino-Alcalasa 2.9 L (GH= 19%) con $S_0= 5,10,15$ y 20 g/L (HBP5, HBP10, HBP15 Y HBP20 respectivamente) y la fracción de permeado menor de 3kDa (UF<3kDa) para cada S_0 .

Samples	Actividad Antioxidante $\mu\text{molTE/g}$ proteína					
	ABTS		FRAP		ORAC	
HBP20	1591,65	$\pm 41,88^a$	117,11	$\pm 4,90^a$	935,21	$\pm 19,13^a$
HBP15	1441,01	$\pm 14,69^a$	130,63	$\pm 5,39^{b,a}$	1043,79	$\pm 20,29^b$
HBP10	1175,24	$\pm 50,63^b$	91,62	$\pm 6,81^{c,a}$	875,75	$\pm 61,57^a$
HBP5	991,12	$\pm 52,93^c$	86,71	$\pm 8,86^c$	854,22	$\pm 30,09^a$
HBP Ultrafiltrados						
UF20<3kDa	1833,98	$\pm 78,54^d$	304,03	$\pm 25,99^d$	1461,36	$\pm 70,17^c$
UF15<3kDa	1719,01	$\pm 171,30^d$	347,25	$\pm 21,28^e$	1302,99	$\pm 78,77^{b,d}$
UF10<3kDa	1596,85	$\pm 138,25^e$	303,74	$\pm 18,20^{f,e}$	1389,08	$\pm 56,97^{c,d}$
UF5<3kDa	1493,13	$\pm 101,41^e$	310,95	$\pm 28,45^{g,f}$	1071,63	$\pm 58,15^f$

Saiga et al. (2003), plantean que la capacidad antioxidante *in vitro* de péptidos está relacionada con la existencia en la cadena de algunos aminoácidos como la tirosina, triptófano, metionina, lisina, histidina y cisteína. Tanto la tirosina (Tyr) por su grupo fenólico -OH, el triptófano (Trp) con su grupo -NH y la cisteína (Cys) con su grupo tiol (SH), pueden donar hidrógenos y/o electrones. Mientras que la metionina (Met) puede ser oxidada hasta Met sulfoxido. Esto significa que, químicamente estos aminoácidos pueden ser efectivos en la eliminación de radicales en técnicas como ABTS y ORAC (Zheng et al., 2016). Otros autores sostienen que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos como Leucina (Leu), Valina (Val) y Fenilalanina (Phe) y prolina (Pro), en las estructuras peptídicas, pueden beneficiar la actividad antioxidante a través de una mejora en el acceso de moléculas no polares al seno de las especies reactivas de interés (Mendis et al., 2005). Los resultados muestran que parece haber una mejora tanto en la capacidad para absorber los radicales de oxígeno, como para neutralizar cationes radicales ABTS en las fracciones peptídicas menores de 3kDa, obtenidas con 20 g/L de sustrato inicial. En contraste con la tendencia general, las fracciones peptídicas ultrafiltradas, obtenidas con una carga de sustrato inicial de 10 g/L, presenta la mayor capacidad *in vitro* para absorber radicales oxígeno (ORAC).

Como se muestra en la Fig. 4.5 la mayor proporción relativa de aminoácidos implicados en la capacidad antioxidante *in vitro* se registran precisamente en las muestras obtenidas con mayor carga inicial (F20<3kDa), seguido por la fracción F10<3kDa. Se destaca la elevada proporción de Lisina, Prolina y Valina en estas muestras. Una mayor presencia de aminoácidos hidrófobos como valina (Val), Leucina (Leu) e Isoleucina (ILE), se identifican en las estructuras peptídicas obtenidas en la F20<3kDa, en contraste con la ausencia de Alanina (Ala) en esta fracción. La presencia de estos aminoácidos, además de la Lisina y Fenilalanina en la posición N-terminal del péptido, se ha relacionado con su potencial antioxidante (Guo et al., 2009). Un análisis de acoplamiento molecular

entre péptidos específicos y el radical ABTS, muestra que residuos de Asp-2, Arg-6, Glu-4 del péptido de semilla de sandía: RDPEER puede formar interacciones hidrofóbicas con ABTS (Wen et al., 2021). De manera similar, los residuos de serina y treonina en los péptidos antioxidantes de mijo (TSSSLNMAVRGGLTR, STTVGLGISMRSASVR) establecen interacciones a través de puentes de hidrógeno con ABTS+ (Agrawal et al., 2019). Todos estos residuos de aminoácidos forman parte importante de los péptidos identificados en la fracción con mayor actividad *in vitro* registrada por la técnica ABTS (F20<3kDa), como se ve en la tabla 4.1.

4.3.4. Péptidos identificados con potencial para la Inhibición de la ACE

Los péptidos identificados en cada una de las fracciones ultrafiltradas se analizaron *in silico* con la plataforma AHTpin (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/ahtpin/help.php>). El cual comprende un modelo QSAR como método para predecir péptidos antihipertensivos de forma eficiente. Modelos con una precisión media del orden del 79% en la detección de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (Basith et al., 2020).

Los péptidos fueron clasificados de acuerdo con su potencial de inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina con SVM scores ≥ 0.9 . En la Fig. 4.6 se muestra la distribución del número medio de péptidos identificados con SVM ≥ 0.9 en cada una de las fracciones peptídicas analizadas. Una mayor cantidad de péptidos con potencial para inhibir la ACE se evidencia en la muestra hidrolizada con carga de 10 g/L de sustrato inicial, seguida por la de menor carga (5 g/L). En contraste una mayor proporción de péptidos con este potencial se registra en las muestras con mayor sustrato inicial (20 g/L), con un 29.11% seguido por la fracción F10<3kDa.

En la tabla 4.2, se muestra los resultados del análisis *in vitro* del grado de inhibición de la ACE de las distintas fracciones peptídicas <3kDa. Los datos fueron tomados con una concentración de proteína de 0.4 mg/mL. El IC₅₀ para las fracciones está en el rango de 0.4-0.7 mg/mL. No existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en los porcentajes de inhibición para las fracciones F15<3kDa y F20<3kDa. La fracción con menor carga inicial de sustrato (5g/L) presenta los mejores porcentajes de inhibición seguidos por la fracción F10<3kDa, que es la fracción con mayor número de péptidos con actividad antihipertensiva *in silico* reportada por AHTpin. La F5<3kDa, cuenta con una mayor presencia relativa de péptidos de bajo peso molecular, lo cual se ha relacionado fuertemente con los aumentos en la capacidad para inhibir ACE (Wu et al., 2006). La tabla 4.3, representa la abundancia relativa (medidas con el área relativa del cromatograma) de los péptidos identificados en cada fracción analizada, con los más altos potenciales para inhibir ACE (SVM score entre 1.7-2.8), según el modelo propuesto en la plataforma AHTpin. Cinco péptidos con abundancia relativa media se identifican en la F5<3kDa. Tres de ellos con SVM score superior a 2.0 que no se identifican en las otras fracciones, entre estos la secuencia VSLPEVPGEY con un SVM score=2.48. Por otro lado, la fracción **F20<3kDa** que presenta una capacidad *in vitro* de inhibición de la ACE significativamente menor ($p < 0.05$) que **la F5<3kDa**, cuenta con una gran presencia relativa de péptidos con alto potencial inhibidor, pero en su mayoría con SVM score inferiores a 2.0. Es posible que la inhibición se deba a un efecto sinérgico de la serie de péptidos presentes. Pero parece existir una relación positiva entre el SVM score reportado por AHTpin y los resultados de inhibición *in vitro*. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hyun and Shin (2000) de hidrolizados de BSA con Alcalasa, en donde se obtuvieron valores de IC₅₀= 0.12 mg/mL en fracciones ultrafiltradas menores a 1 kDa (Hyun & Shin, 2000). También son consistentes con los

obtenidos por Lafarga et al. (2016), que evidencia el aumento de la Inhibición de la ACE con las filtraciones seriadas de 10-1 kDa. En este estudio se logran Inhibiciones del orden el 70% para ensayos con 1mg/mL de sustrato en hidrolizados ultrafiltrados de BSA con papaína (Lafarga, Aluko, et al., 2016). Se ha reconocido que, el efecto antihipertensivo de hidrolizados enzimáticos de proteínas se puede atribuir básicamente unidades peptídicas con masas moleculares inferiores a 3 kDa. También, se ha comprobado que estas fracciones peptídicas no solo pueden inhibir *in vitro* la ACE, sino que, por ejemplo, con péptidos de bajo peso molecular de un hidrolizado de LF (LFH) obtenido por tratamiento enzimático con pepsina, se puede obtener un efecto hipotensor in vivo significativo (-15.4 ± 3.8 mm Hg) en ratas (Lafarga, Aluko, et al., 2016). Estos resultados son relevantes en cuanto ponen de manifiesto el potencial antihipertensivo de las fracciones obtenidas, si consideramos la ventaja de que los productos proceden de materias primas y procesos que exigen requerimientos de purificación mínimos.

Factores como el tamaño molecular, el tipo de aminoácido y la secuencia de estos en la cadena, juegan un papel importante en la actividad antihipertensiva de los péptidos (Hernández-Ledesma et al., 2011). Entre estos, los más eficientes suelen ser péptidos de cadenas laterales hidrofóbicas con gran volumen. En el análisis de mecanismos moleculares de interacción de la ACE e inhibidores peptídicos de ACE, ha puesto en evidencia la relevancia de residuos hidrófobos como el triptófano en la interacción química con el Zinc a través de la coordinación con el oxígeno carboxilo (Yan et al., 2020). Muchos de los péptidos con potencial bioactivo para inhibir la ACE están compuestos de residuos de aminoácidos hidrofóbicos o aromáticos, como prolina, fenilalanina, tirosina y triptófano (Ashok et al., 2019). La fracción F20<3kDa y F10<3kDa tienen elevada proporción relativa de péptidos que contienen prolina que según se mencionó los haría más resistentes a la digestión gastrointestinal (Ashok et al., 2019).

Tabla 4. 2. Porcentaje de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) y IC_{50} de las fracciones peptídicas (F5-F20). Usando 0.4 mg/mL como concentración de sustrato S_0 .

FRACCIÓN	%ACE INHIBICIÓN	IC_{50} (mg/mL)
F5	53.73 ± 3.08^a	0.41
F10	47.00 ± 1.27^b	0.66
F15	38.30 ± 1.21^c	0.65
F20	35.96 ± 1.55^c	0.86

Nota: Los resultados se informan como el porcentaje de actividad inhibidora y se expresan como la media de las determinaciones por triplicado mínimo ($n = 3$). Las letras en superíndice indican diferencias significativas entre las fracciones dentro de los ensayos ($p < 0,05$).

4.3.5. Acoplamiento molecular de péptidos con potencial inhibidor de ACE

De acuerdo con los resultados, la F5 tiene el mayor potencial *in vitro* para inhibir la ACE, seguido por la F10 y F15. Cuatro péptidos con elevado SVM score, dado por el software AHTpin y con presencia relativa importante en F5, F10 y F15 se seleccionaron para realizar el análisis de acoplamiento molecular con la ACE. Con el fin de determinar en forma simulada, el potencial

antihipertensivo de la fracción y su relación con la presencia de algunos péptidos específicos en estas. En la Figura 4.7, se muestra el análisis de acoplamiento de los cuatro péptidos identificados de acuerdo con la mayor energía de unión de estos con el centro activo de la ACE. Para el acoplamiento, se tuvo en cuenta el valor de afinidad para los cuatro modos de unión más favorables de cada péptido en el sitio activo de la ACE. De los cuatro péptidos analizados, el péptido -YNPDIKVK- presenta el índice de unión más favorable de -27,5 Kcal/mol. Está presente en F15, pero en una proporción relativa baja. Mientras que los tres péptidos restantes, con índice de afinidad similar: -GEVLPLPEANFPSF- (-22,6 Kcal/mol), -VSLPEVPGEY- (-21,7 Kcal/mol) y -VSFTLPRSPTSQE- (-21,8 Kcal/mol), coinciden en la F5, con una abundancia relativa mayor comparada con el primer péptido mencionado. Este último péptido está presente también en la F10.

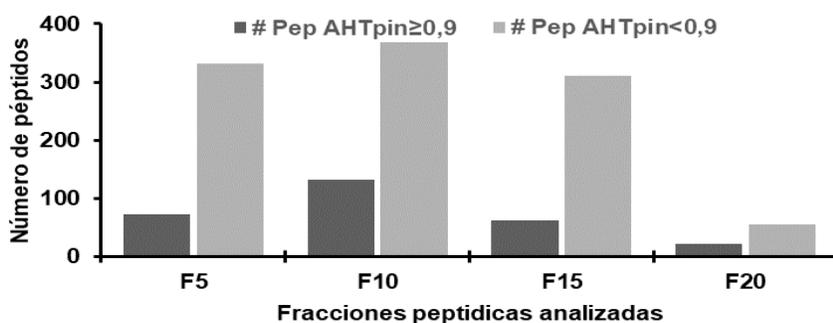


Fig. 4.6. Número de péptidos encontrados en las fracciones: F5, F10, F15 and F20 ($S_0 = 5, 10, 15$ and 20 g/L, respectivamente) con un SVM score mayor o igual a $0,9$ y con SVM score más bajos que $0,9$ de acuerdo con los resultados obtenidos con la plataforma AHTpin (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/ahtpin/help.php>).

Tabla 4.3. Abundancia relativa de secuencias de péptidos con más Elevado SVM identificadas en las fracciones peptídicas con más alto potencial antihipertensiva. Expresada en porcentaje de area de pico con el cromatograma para cada peptide identificado en relación al número total de picos identificados.

SECUENCIA	SVM SCORE	FRACCIÓN	ABUNDANCIA RELATIVA (%)
VSLPEVPGEY	2.48	F5	0.53
GEVLPLPEANFPSF	2.02	F5	0.04
LRPVPPISGGGY	1.79	F10	0.30
		F15	0.30
		F20	1.09
VSFTLPRSPTSQE	2.32	F5	0.31
YNPDIKVK	2.77	F10	0.03
LSGQLPSPSKVPVF	1.85	F15	0.03
		F5	0.15
		F10	0.81
		F20	1.04
SPDLEPVLRY	1.79	F5	0.02
		F10	0.03
		F15	0.03
		F20	1.04
EAPSLRPVPPISGGGY	1.71	F20	2.8

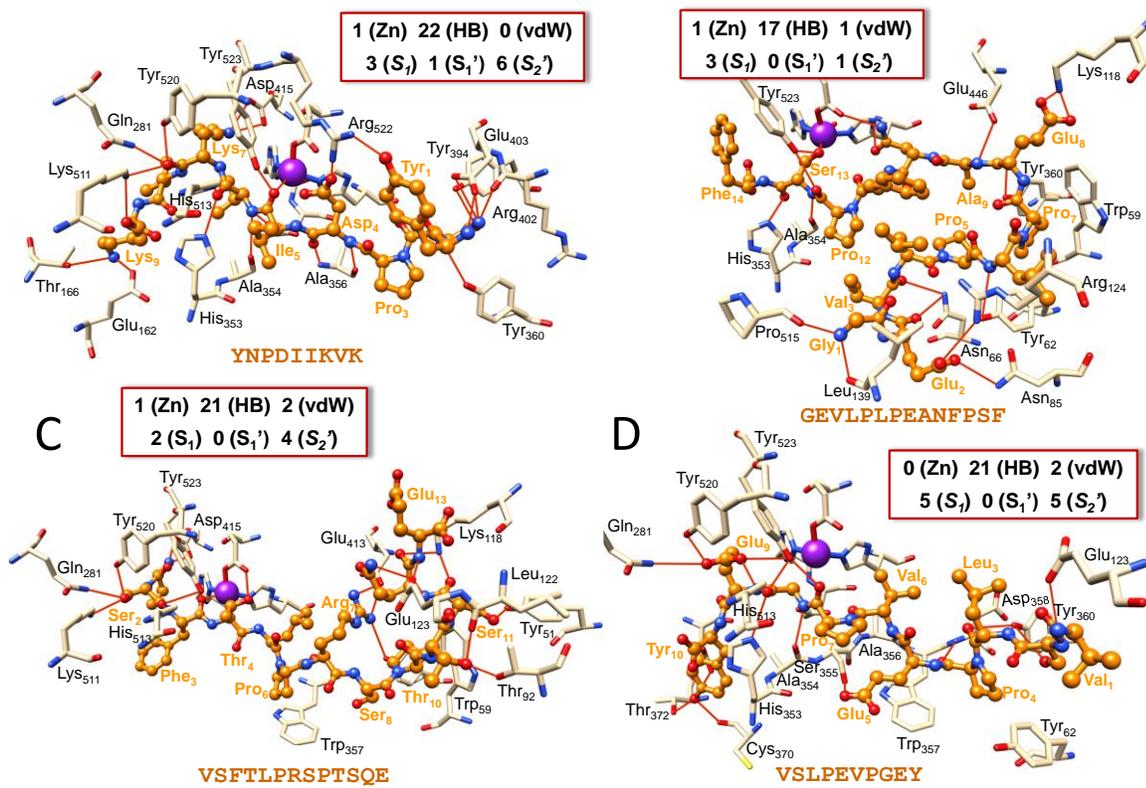


Fig. 4.7. Vista de primer plano de los contactos enzima-ligando en complejos entre la ACE y péptidos seleccionados (A: YNPDOOKVK, B: GEVLPLPEANFPSF, C: VSFTLPRSPTSQE, D: VSLPEVPGEY). Los átomos del ligando se muestran en forma de ball-and-stick (C en naranja, O en rojo y N en azul). El número de contactos de ACE-péptido se indica para cada complejo (Zn: Zn-O interacciones, HB: enlaces de hidrógeno y VdW: interacciones de Van der Waals). El número de contactos con los residuos de ACE en el S1 (Ala354, Glu384, and Tyr523), S1' (Glu162), y S2' (Gln281, His353, Lys511, His513, and Tyr520) también se incluyen sitios de unión (residue numbering as in the 1O86 PDB structure).

Una búsqueda en el base de datos de BIOPEP-UWM (<https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>, accedido el 24/5/2022), muestra que los péptidos identificados no han sido reportados con anterioridad. Sin embargo, algunos tripéptidos y dipéptidos (como, por ejemplo: LPL, PLP y EY), reportados con actividad IECA, se encuentran haciendo parte de las estructuras peptídicas identificadas (Minkiewicz et al., 2019), en especial las presentes en las F5.

En el análisis se muestra que, dicha interacción se debe principalmente a enlaces de hidrógeno y en menor proporción a interacciones de Van del Waals. En su estructura molecular, la ACE tiene tres sitios activos principales: S1 con tres residuos (Ala354, Glu384 y Tyr523); S2' que comprende los residuos (Gln281, His353, Lys511 e His513); y el sitio S1' el cual contiene el residuo Glu162 (Hall et al., 2020). El péptido -YNPDIKVK- que tiene la mejor afinidad energética con la ACE, se acopla eficientemente con esta a través de la unión con 22 enlaces de hidrógeno. Entre estos, los enlaces formados entre grupos carbonilos del péptido y los residuos característicos de los sitios S1, S2' y S1'. Además de una Interacción con el ion zinc.

Aunque no registró ninguna interacción con el ion zinc, -VSLPEVPGEY- interactuó eficientemente con el centro activo de la ACE, a través de 21 enlaces de hidrógeno y dos de Van del Waals. En especial con los residuos His353, Tyr520 e His513 en el sitio S2'; y Ala354 y Tyr523 en el sitio S1. Por su parte, los péptidos -GEVLPLPEANFPSF- y -VSFTLPRSPTSQE-, tienen cada uno, una interacción con el ion zinc a través de enlaces de hidrógeno con un grupo carbonilo de la serina y la fenilalanina respectivamente. Hay también enlaces de hidrógeno con los residuos Ala354 y Tyr523 en el sitio S1. Estos dos péptidos también establecieron enlaces de hidrógeno con los residuos de Tyr523 en el sitio S1 y de His353 en S2'. Los tres péptidos presentes en la F5 tienen un importante potencial para inhibir la ACE, a juzgar por gran número y tipo de interacciones en el interior del centro activo, incluidas enlaces con el ion zinc. Estas interacciones, especialmente las producidas por enlaces de hidrógeno, juegan un papel importante en la estabilización del complejo ACE-péptido no catalítico (Mirzaei et al., 2018). Estos péptidos son ricos en prolina, un aminoácido hidrofóbico cuya presencia y proximidad a la posición C en la cadena peptídica, se ha relacionado con éxito a la inhibición de la ACE (Mirzaei et al., 2018).

4.4. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos, es evidente que, si el objetivo es obtener péptidos con el menor tamaño posible, es más adecuado realizar la hidrólisis de Alcalasa de las proteínas plasmáticas tras la diálisis del plasma bovino. La naturaleza de los inhibidores presentes en el plasma crudo no ha sido resuelta, aunque debido a la presencia relativamente alta de sales en el plasma y al conocimiento de su capacidad para influir en la velocidad de las reacciones enzimáticas, pueden ser los responsables de dicha disminución en el rendimiento de la hidrólisis. Además, como se demostró en el presente estudio, el aumento de la concentración inicial de proteína en el reactor, manteniendo constante la relación enzima-sustrato, condujo a la obtención de una mezcla de péptidos con un tamaño mayor y una composición de aminoácidos ligeramente diferente, probablemente debido a cambios en la selectividad enzimática. En consecuencia, los hidrolizados mostraron diferentes capacidades antioxidantes y antihipertensivas. En este sentido, el hidrolizado con los péptidos más pequeños mostró mayores propiedades antihipertensivas, ya que estos péptidos tienen que poder interactuar con el estrecho centro activo de la ACE. Por otro lado, el hidrolizado con la mayor concentración en Pro, Gly y Ser mostró mayores propiedades antioxidantes. Esto significa que, los cambios en la concentración inicial de sustrato han demostrado ser una forma fácil y económica de modular la bioactividad de los hidrolizados obtenidos.

REFERENCIAS

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, *136*(3–4), 1435–1443. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.09.053>
- Agrawal, H., Joshi, R., & Gupta, M. (2019). Purification, identification and characterization of two novel antioxidant peptides from finger millet (*Eleusine coracana*) protein hydrolysate. *Food Research International*, *120*, 697–707. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.11.028>
- Ashok, A., Brijesha, N., & Aparna, H. S. (2019). Discovery, synthesis, and in vitro evaluation of a novel bioactive peptide for ACE and DPP-IV inhibitory activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *180*, 99–110. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.07.009>
- Basith, S., Manavalan, B., Hwan Shin, T., & Lee, G. (2020). |: A next-generation tool for rapid disease screening. *Medicinal Research Reviews*, *40*(4), 1276–1314. <https://doi.org/10.1002/med.21658>
- Butré, C. I., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2014). Determination of the influence of substrate concentration on enzyme selectivity using whey protein isolate and bacillus licheniformis protease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(42), 10230–10239. <https://doi.org/10.1021/jf503151f>
- Butré, C. I., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2012). Effects of ionic strength on the enzymatic hydrolysis of diluted and concentrated whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(22), 5644–5651. <https://doi.org/10.1021/jf301409n>
- Butré, C. I., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2014). Influence of water availability on the enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, *49*(11), 1903–1912. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.08.009>
- Caprioli, R. M., Malorni, A., & Sindona, G. (2012). *Selected Topics in Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences*. Springer Netherlands. <https://books.google.es/books?id=L84TnwEACAAJ>
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, *135*(4), 3020–3038. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.06.100>
- Creusot, N., Wierenga, P. A., Laus, M. C., Giuseppin, M. L. F., & Gruppen, H. (2011). Rheological properties of patatin gels compared with β -lactoglobulin, ovalbumin, and glycinin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(2), 253–261. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.4178>
- Cushman, D. W., & Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, *20*(7), 1637–1648. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(71\)90292-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(71)90292-9)
- de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International*, *74*, 185–198. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.05.013>
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, *86*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.06.018>
- Duarte, R. T., Carvalho Simões, M. C., & Sgarbieri, V. C. (1999). Bovine Blood Components: Fractionation, Composition, and Nutritive Value. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(1), 231–236. <https://doi.org/10.1021/jf9806255>
- Fernández, A., & Riera, F. (2013). β -Lactoglobulin tryptic digestion: A model approach for peptide release. *Biochemical Engineering Journal*, *70*, 88–96. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.10.001>

- Fredslund, F., Jenner, L., Husted, L. B., Nyborg, J., Andersen, G. R., & Sottrup-Jensen, L. (2006). The Structure of Bovine Complement Component 3 Reveals the Basis for Thioester Function. *Journal of Molecular Biology*, *361*(1), 115–127. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2006.06.009>
- Guo, H., Kouzuma, Y., & Yonekura, M. (2009). Guo, H., Kouzuma, Y., & Yonekura, M. (2009). Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*, *113*(1), 238–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.081> Structures and properties of . *Food Chemistry*, *113*(1), 238–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.081>
- Hall, F., Reddivari, L., & Liceaga, A. M. (2020). Identification and Characterization of Edible Cricket Peptides on Hypertensive and Glycemic In Vitro Inhibition and Their Anti-Inflammatory Activity on RAW 264.7 Macrophage Cells. *Nutrients*, *12*(11). <https://doi.org/10.3390/nu12113588>
- Henning, A. K., Groschup, M. H., Mettenleiter, T. C., & Karger, A. (2014). Analysis of the bovine plasma proteome by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight tandem mass spectrometry. *The Veterinary Journal*, *199*(1), 175–180. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2013.10.029>
- Hernández-Ledesma, B., Del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, *165*(1), 23–35. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2010.11.001>
- Hyun, C.-K., & Shin, H.-K. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin {I} converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, *36*(1–2), 65–71. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00176-X)
- Lafarga, T., Aluko, R. E., Rai, D. K., O'Connor, P., & Hayes, M. (2016). Identification of bioactive peptides from a papain hydrolysate of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, *81*, 91–99. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.01.007>
- Lafarga, T., Wilm, M., Wynne, K., & Hayes, M. (2016). Bioactive hydrolysates from bovine blood globulins: Generation, characterisation, and in silico prediction of toxicity and allergenicity. *Journal of Functional Foods*, *24*, 142–155. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2016.03.031>
- M. Broering, J., & S. Bommarius, A. (2005). Evaluation of Hofmeister Effects on the Kinetic Stability of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, *109*(43), 20612–20619. <https://doi.org/10.1021/jp053618+>
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, *77*(17), 2166–2178. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2005.03.016>
- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., & Aminlari, M. (2018). Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates: Purification and molecular docking. *Journal of Food and Drug Analysis*, *26*(2), 696–705. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.07.008>
- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chemistry*, *194*, 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.122>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & L. Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>

- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rutherford, S. M. (2010). Rutherford, S. M. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in nal of AOAC INTERNATIOHydrolysates: A Review. *JourNAL*, 93(5), 1515–1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515> Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of P. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(5), 1515–1522. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.5.1515>
- Salgado, P. R., Fernández, G. B., Drago, S. R., & Mauri, A. N. (2011). Addition of bovine plasma hydrolysates improves the antioxidant properties of soybean and sunflower protein-based films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1433–1440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.003>
- Seo, H.-W., Jung, E.-Y., Go, G., Kim, G.-D., Joo, S.-T., & Yang, H.-S. (2015). Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 185, 106–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.133>
- Tirumalai, R. S., Chan, K. C., Prieto, D. R. A., Issaq, H. J., Conrads, T. P., & Veenstra, T. D. (2003). Characterization of the Low Molecular Weight Human Serum Proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(10), 1096–1103. <https://doi.org/10.1074/MCP.M300031-MCP200>
- Trusek-Holownia, A., & Noworyta, A. (2015). A model of kinetics of the enzymatic hydrolysis of biopolymers – a concept for determination of hydrolysate composition. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 89, 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2015.01.008>
- Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., & Almonacid, S. (2015). Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 50(4), 589–597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028>
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2021). Study on the structure–activity relationship of watermelon seed antioxidant peptides by using molecular simulations. *Food Chemistry*, 364, 130432. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.130432>
- Winters, A. L., & Minchin, F. R. (2005). Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Analytical Biochemistry*, 346(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2005.07.041>
- Wu, J., Aluko, R. E., & Nakai, S. (2006). Structural Requirements of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides: Quantitative Structure–Activity Relationship Study of Di- and Tripeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 732–738. <https://doi.org/10.1021/jf0512631>
- Yan, W., Lin, G., Zhang, R., Liang, Z., Wu, L., & Wu, W. (2020). Studies on molecular mechanism between ACE and inhibitory peptides in different bioactivities by 3D-QSAR and MD simulations. *Journal of Molecular Liquids*, 304, 112702. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2020.112702>
- Zheng, L., Zhao, Y., Dong, H., Su, G., & Zhao, M. (2016). Structure–activity relationship of antioxidant dipeptides: Dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues. *Journal of Functional Foods*, 21, 485–496. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.003>

CAPÍTULO 5. FENÓMENOS DE INHIBICIÓN POR PRODUCTO: DEFINICIÓN DE UN MODELO CINÉTICO-CONCEPTUAL DE LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE PLASMA BOVINO- ALCALASA 2.9L

RESUMEN

En este capítulo se evaluó el efecto inhibitor de las fracciones peptídicas, obtenidas mediante hidrólisis enzimática de plasma bovino, sobre la enzima utilizada en la reacción (Alcalasa 2,4 L). En este sentido, se utilizaron fracciones peptídicas ultrafiltradas de diferentes tamaños moleculares (A: Fracción >10; B: Fracción 10-3 kDa; y C: Fracción <3 kDa), para verificar el impacto en la tasa de hidrólisis total. Las fracciones entre 3-10 kDa se obtuvieron y se utilizaron para evaluar el ajuste de un modelo cinético conceptual que considera la inhibición por producto y sustrato. Además, se evaluó la inactivación de la enzima a lo largo del tiempo de reacción y se incorporaron sus efectos en el modelo. Se demostró que algunos péptidos liberados en las sucesivas etapas de la reacción pueden a su vez inhibir la actividad de la enzima de hidrólisis. El modelo evaluado sugiere una expresión de los parámetros de inhibición que varían en el tiempo en función de la concentración inicial del sustrato en la reacción. Esto se basa en los cambios cinéticos de los perfiles del producto para cada tiempo de reacción en las condiciones de operación evaluadas (variable S_0). Un mayor efecto inhibitor debido a los productos se evidencia cuando la reacción ocurre con una mayor carga del sustrato inicial ($S_0=20$ g/L).

Palabras clave: Modelamiento matemático; enzimólisis de proteínas; cinética enzimática

5.1. INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que los péptidos derivados de hidrólisis enzimática de proteínas tienen importantes potenciales bioactivos (Bhandari et al., 2020). En capítulos anteriores se discutió el poder antioxidante y antihipertensivo *in vitro* ejercido por fracciones peptídicas derivadas de la hidrólisis de proteínas de sangre bovino con Alcalasa (subtilisina). Desde el punto de vista químico, las proteasas actúan como catalizadores de la hidrólisis de enlaces peptídicos en porciones de la secuencia proteica, atendiendo a la especificidad de las mismas. Esto permite liberar péptidos de naturaleza química distinta, en el tiempo, a través, de un proceso dinámico que depende del mecanismo de reacción (Beaubier et al., 2021).

En el caso de la hidrólisis de proteínas este mecanismo es particularmente complejo, puesto que, aunque en teoría, la enzima sea capaz de escindir todos los enlaces por los cuales tiene afinidad, en la práctica, esta eficiencia de ruptura está condicionada a muchos aspectos. Algunos de los cuales, son externos y controlables como el caso del pH, la Temperatura y la relación enzima/sustrato (E/S). Sin embargo, las posibilidades de disposición de los 20 aminoácidos naturales en la cadena de proteínas infieren un alto grado de complejidad química en la dinámica de escisión por parte de la proteasa. Por lo que, el resultado de la hidrólisis es una composición cualitativa y cuantitativa de una gran variedad fisicoquímica (Anna Trusek-Holownia & Noworyta, 2015). La cual, se hace más compleja, en el caso de sustratos con numerosas proteínas de reactividad y naturaleza distinta en el equilibrio, como el caso de las matrices alimentarias o subproductos proteicos no purificadas.

La producción de hidrolizados enzimáticos en sistemas de reacción controlados ocurre generalmente a temperatura y pH constante, de acuerdo con los valores óptimos de la enzima seleccionada (Kristinsson & Rasco, 2000). La relación E/S y el tiempo se establecen de acuerdo a las funcionalidades deseadas y la recuperación de proteínas de los hidrolizados finales (He et al., 2013). De acuerdo con la teoría de Linderstrøm-Lang, el mecanismo de ruptura puede cambiar en condiciones de sustrato variado, aproximando su comportamiento a un mecanismo Zipper o uno one-by-one. De acuerdo con la preferencia de la enzima por la cadena proteica original o por los fragmentos intermedios derivados de las primeras rupturas (Deng, Butré, et al., 2018). Al respecto, se ha demostrado que las afinidades enzimáticas hacia las proteínas intactas fueron diferentes en la hidrólisis de Alcalasa cuando se operaba el sistema de reacción a varias concentraciones de sustrato inicial (Butré et al., 2014). Estos cambios en el mecanismo de hidrólisis son inducidos por las distintas concentraciones de sustrato, mas no por los cambios en E/S (Deng, Butré, et al., 2018). Debido a estos diferentes mecanismos, los hidrolizados producidos por hidrólisis a diferentes concentraciones de sustrato, tienen diferentes perfiles peptídicos y algunos de estos péptidos pueden inhibir la proteasa (Deng, Butré, et al., 2018; Deng, van der Veer, et al., 2018), causando justamente la modificación en la dinámica de formación de péptidos en cada condición de sustrato. En su análisis de los mecanismos cinéticos implícitos en la hidrólisis enzimática del musculo de Salmón, Valencia et al., (2014) concluyeron que la disminución en la tasa de hidrólisis en la reacción (forma típica de la curva de hidrólisis) se debe principalmente a la inhibición de la reacción por productos y a la desactivación térmica de la enzima. Sus resultados indican que, los péptidos más grandes tienen un efecto inhibitor mayor que las fracciones más pequeñas. Sin embargo, el efecto inhibitor no es necesariamente más fuerte para GHs bajos comparados con los más altos, ya que esto también depende de la concentración de estos péptidos (Valencia et al., 2014). Los resultados son relevantes si tenemos en cuenta que la propuesta de Marquez-Moreno y Fernandez-Cuadrado (1993), al respecto de las razones por las cuales se da la forma típica de la

curva de hidrólisis, han sido discutidos por varios autores en reacciones enzimáticas de fuentes variadas de proteínas, donde se ha sugerido que esta forma se debe básicamente a: (a) Disminución en la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a la hidrólisis por las proteasas (agotamiento del sustrato), (b) inhibición de las enzimas causada por productos de la hidrólisis; (c) desnaturalización térmica de la enzima.

Los modelos cinéticos para el estudio de la hidrólisis de proteínas a menudo asumen que el inhibidor se une al complejo ES en la región donde: $K_m \ll S_0$ y $[S] = S_0$, esto permite integrar el fenómeno en la forma de una ecuación exponencial, donde la velocidad $r = S_0 h_{tot} * d(GH)/dt = a * \exp(-b * GH)$. Expresiones de éste tipo, han sido empleadas en reactores batch, para explicar la velocidad de hidrólisis enzimática de orden cero y desactivación de la enzima en sustratos como: caseínas (Rubio et al., 1993), lacto albuminas (González-Tello et al., 1994), hemoglobina bovina (Márquez & Vázquez, 1999). Mientras que desactivación enzimática e inactivación por sustrato, fue corroborado en un sistema BSA-tripsina (Qi & He, 2006).

Pese a que, en algunos casos la inhibición por productos es analizada, no siempre se acompaña el análisis del modelo con evidencia experimental del fenómeno y tampoco se explica, en qué medida estos inhibidores pueden afectar la forma de curva (Sousa et al., 2004). Puesto a que existe un efecto inhibidor probado de algunos péptidos formados en el transcurso de la hidrólisis enzimática de proteínas. Valencia et al., (2014), han demostrado que una estrategia adecuada para el desarrollo de modelo cinético completo, pasa por analizar, las contribuciones de estos efectos sobre la respuesta de la enzima. Al respecto, proponen una estrategia, en la cual, determinan constantes de inhibición tras la adición al sustrato de hidrolizados con leve (GH=5%) y avanzado (GH=20%) grado de hidrólisis, como una medida indirecta de la presencia de compuestos de alto y bajo peso molecular, respectivamente.

En el presente trabajo se propuso validar un modelo cinético, basado en los mecanismos de inhibición por efectos del sustrato y producto y, la desactivación térmica de la enzima en presencia del sustrato, como una estrategia para analizar el posible efecto de los fenómenos de inhibición sobre la producción de péptidos con potencial bioactivo en condiciones variables de sustrato inicial, manteniendo la relación E/S sustrato fija. La inhibición se determinó experimentalmente a través de la adición de productos de pesos moleculares de tamaño controlado y el análisis de la influencia de la concentración de péptidos inhibidores en la repuesta de la capacidad de la enzima (Alcalasa 2.4L) para escindir enlaces peptídicos de proteínas de plasma bovino. El modelo sugiere una expresión variable de los parámetros de inhibición, fundamentado en los cambios cinéticos de los perfiles de productos para cada tiempo de reacción en cada condición de operación evaluada en el estudio.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Materiales y ensayos de hidrólisis

La sangre fresca bovina suministrada por un frigorífico de la ciudad (Oviedo-España), se centrifugó a 5.000 RPM por 10 min a 2°C. El plasma obtenido, fue dializado utilizando membranas de diálisis de celulosa (D9402-100FT, Sigma-Aldrich) en agua destilada. La concentración de proteínas de 8.4 ± 0.42 % fue determinada por el método de Lowry modificado (Winters & Minchin, 2005). Posteriormente fue diluido con agua destilada a las distintas concentraciones requeridas, en cada

fase del experimento. Las reacciones se llevaron a cabo por fases, en Erlenmeyer de 0.02 L y 0.1 L conectados a un sistema de ajuste automático de pH (pH-Buret 24 2s, Crison, España) y un agitador isotérmico. La temperatura y el pH se mantuvieron constantes en los valores óptimos de 60 +/- 1 °C y 9.0 respectivamente. Para la hidrólisis se utilizó Alcalase 2.9 L (2,4 AU-A/g) grado alimentario (EC: 3.4.21.14, CALBIOCHEM, Canadá).

El monitoreo de los productos de reacción se hizo a través del método método pH-stat utilizando soluciones de NaOH de 0.1-1.0 M, de acuerdo con las condiciones experimentales. Los <<mmol>> de enlaces α -NH escindidos en el tiempo, se calcularon con la ecuación (1) y la concentración (mM) de acuerdo con cada volumen usado fue estimada.

$$\alpha - NH(mM) = \frac{V \cdot N}{\alpha} \quad (1)$$

Donde B es el volumen de NaOH, N la concentración Molar y α una función de pK f(T) y el pH como le expresión (4.2 y 4.3).

5.2.2. Construcción de modelo cinético plasma bovino-Alcalasa

La hidrólisis enzimática de plasma bovino es sumamente compleja pues en esta matriz se han identificado cerca de 500 proteínas (Henning et al., 2014). Una gran proporción de estas la representa BSA, una proteína globular con difícil acceso para la escisión, debido a numerosos puentes disulfuros (Adjonu et al., 2013). Mientras tanto la Alcalasa es una enzima con una alta especificidad por una cantidad considerable de aminoácidos, entre ellos: residuos aromáticos (Phe, Trp, Tyr), ácido (Glu), que contiene azufre (Met), alifático (Leu,Ala), residuos de hidroxilo (Ser) y básicos (Lys) (Adamson & Reynolds, 1996; A Trusek-Holownia, 2008). Algunas suposiciones son importantes a la hora de establecer el modelo:

1. Puesto que hay muchas proteínas en distintas proporciones de secuencia diferente y atendiendo a que el ataque químico de la enzima es en el enlace peptídico, considérese como el sustrato la concentración inicial enlaces peptídicos, definidas como los moles del mismo en solución.
2. La selectividad de la Alcalasa, se relaciona con la especificidad de la misma hacia residuos específicos. Esta selectividad puede variar con la T, el pH y con la concentración de sustrato de operación. La T y pH, se mantienen constantes y se analizan solo los efectos relacionados con el sustrato.
3. En cada paso de la reacción (un ataque enzimático) se escinde un solo enlace peptídico, liberando un grupo α -NH que puede ser cuantificado por el método: pH-stat.
4. La ecuación que gobierna los mecanismos de reacción incluye efectos conjuntos de inhibición por sustrato y producto y desactivación de la enzima (primer orden).
5. Las constantes de inactivación por producto son una función de la ruptura, puesto que cada ruptura libera péptidos distintos, lo que configura una comunidad de compuestos distintos en cada tiempo.

Los datos experimentales para la definición del modelo se tomaron a concentraciones de sustrato

inicial variada desde 1 hasta 20 g/L, es decir concentraciones de 41.5-166 mM. Tomando el valor de 8.3 mmol/g proteína. La concentración de Alcalasa (E_0), fue la misma de 300 (mg/L), para todas le ejecuciones.

5.2.3. Validación del modelo

Puesto que el modelo propuesto se utiliza para analizar el efecto de la inhibición de los productos, sobre el comportamiento la hidrólisis en general y el ajuste de datos experimentales. Se utilizó en la validación un set de experimentos a distintos niveles de sustrato inicial, donde la relación E:S se mantiene constante 1:25. En el Capítulo 4, se ha demostrado que, en estas condiciones, perfiles peptídicos distintos se obtienen cuando se hidroliza plasma bovino con Alcalasa, pese a que los valores de GH_{final} son estadísticamente no diferenciables. En la tabla 1, se muestra el abordaje experimental utilizado para validar el modelo. Planificación experimental para evaluar el modelo matemático propuesto

Tabla 5.1. Planeación experimental para evaluar modelo matemático propuesto.

[S ₀] (g/L)	[S ₀] (mM)	[S Realmente escindibles por Alcalasa] (mM)	E ₀ (g/L)
5	41,5	8,300	0,2
10	83	16,600	0,4
15	124,5	24,900	0,6
20	166	33,200	0,8

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Estimación de parámetros cinéticos

En este análisis, se utilizó, la concentración de enlaces escindidos por la enzima, en vez del GH, como descriptor para avance de la reacción. Esto es debido a que, la concentración de enlaces, proporciona una alternativa viable para el cálculo de constantes en unidades consistentes. Los parámetros cinéticos se obtuvieron del análisis gráfico a través del desarrollo de la curva de saturación clásica (S_0 Vs v_0). Las velocidades iniciales se determinaron por duplicado, con la pendiente de la curva de producto Vs tiempo (Fig.5.1 a), para los primeros 7 min de reacción. Utilizando el método de pH-stat, para el cálculo de la concentración de enlaces rotos.

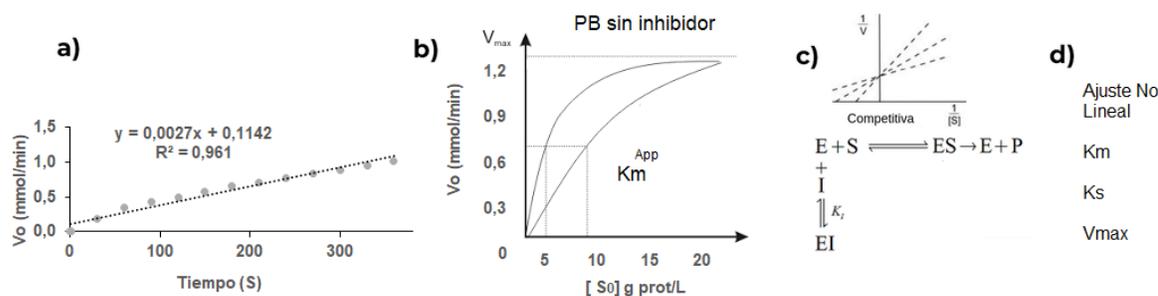


Fig. 5.1. Pasos a seguir en la determinación de parámetros cinéticos del modelo de análisis. Los parámetros k_m , k_s y V_{max} se estimaron por análisis no lineal de ecuación (5.2), utilizando Curve

Fitting Tool de Matlab con los datos de la curva S_0 Vs v_0

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot S_0}{K_m + S_0 + (S_0^2/K_s)} \quad (5.2)$$

Esta ecuación, contempla los efectos de inhibición relacionados con la presencia del sustrato. Los resultados, experimentales sugieren la presencia marcada de estos efectos, para concentraciones de sustrato inicial relativamente mayores. Se conservo este efecto en el análisis del modelo global, por considerar que tiene un papel clave en la definición de la forma de curva aún en las concentraciones evaluadas.

Los valores de las constantes evaluadas se muestran en la tabla 5.2, comparadas con las obtenidas por Valencia et al: (2014), pese a la diferencia en los valores de pH con la que se obtuvieron. Los valores de K_s para el sistema plasma-Alacala, son sustancialmente mayores que los obtenidos cuando se utiliza musculo de Salmon como sustrato. Esto sugiere un menor efecto de inhibición debido al sustrato, para el caso del plasma. La especificidad en cambio (V_{max}/K_m), es menor para el caso del plasma bovino, debido a las grandes diferencias encontradas en los valores de K_m (producto entre otros efectos de las diferencias en el pH). En investigaciones similares con Alcalasa y proteínas de torta de sésamo se evidencia un K_m mayor de 41,17 g/L para pH=8.5 y T=55 °C (Demirhan et al., 2011), un poco más bajas que los niveles usados en este estudio. Por otra parte, Sousa Jr et al., (2004), reporta $K_m=47,3$ mM, en un sistema Alcalasa (inmovilizada) y proteínas de suero lácteo.

Tabla 5. 2. Constantes cinéticas evaluadas por ajuste no línea de la ecuación (1) con efectos de inhibición por sustrato. Datos experimentales tomados a pH=9 y T=60 °C.

Fuente	V_{max} (mM)	K_m (mM)	K_s (mM)	V_{max}/K_m
Propia	1.25	83	951	0.015
Valencia et al; (2014)	2.12	9.54	233	0.058

5.3.2. Análisis de Inhibición por producto de hidrólisis

Alcalasa puede ser inhibida en el transcurso de la reacción en forma similar como muchas proteasas, en efecto, son inhibidas por péptidos resultantes de la hidrólisis. Este fenómeno es parecido al ocurrido, por ejemplo, con la enzima convertidora de la Angiotensina (ECA), en la exposición de la capacidad antihipertensiva de péptidos resultantes de la ruptura de proteínas de muchas fuentes (Tacias-Pascacio et al., 2020).

A manera de ejemplo, la proporción molar de péptidos inhibidores para inhibir completamente la ACE varía de 26:1 a >1300:1 y se sabe también que cambios en el pH, la temperatura y la E:S de la hidrólisis de la proteína alteran la actividad inhibidora de la ECA de los hidrolizados (Deng, Butré, et al., 2018), como lo demostramos en el Capítulo 4 para el caso de la E/S.

Como se ha planteado, en estos efectos de inhibición, existen tres elementos importantes a considerar: 1) la fuente de inhibición, 2) la concentración del inhibidor y 3) el mecanismo cinético

del mismo. La estrategia típica y adecuada para estudiar estos efectos es la adición de inhibidores a distintas concentraciones en el sistema de reacción, para evaluar el efecto sobre el K_m y la V_{max} . Siguiendo la lógica de Valencia et al., (2014) y Demirhan et al., (2011) se tomaron ultrafiltrados de tres tamaños moleculares distintos: A (Fracción >10 kDa), B (Fracción 10-3 kDa) y C (Fracción <3 kDa). Estos ultrafiltrados, los cuales, contenían solo péptidos en rango de tamaños descritos se adicionaron a distintas concentraciones hasta obtener por lo menos un 40% de inhibición en los valores de velocidad inicial. Las fracciones de mayor y menor tamaño tuvieron poco efecto sobre la velocidad, en comparación con la obtenida con fracción B. Pues una adición de 3.7 mM apenas logró disminuir un 5 y 17% la velocidad inicial medida con concentraciones de sustratos cerca del valor de K_m .

Por esta razón, la fracción B, se seleccionó para esta fase exploratoria del análisis de inhibición. Dos concentraciones de estas fracciones se usaron en el estudio: $I_1 = 3.735$ e $I_2 = 7.47$ mM para analizar el efecto sobre k_m^{app} y V_{max}^{app} en el modelo de la ecuación (5.3), a través del análisis de la curva (v_0 Vs S_0) en la Fig.5.1b.

$$\frac{\frac{V_{max}}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} [S]}{\frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + [S]} = \frac{V_{max}^{app} [S]}{K_m^{app} + [S]} \quad (5.3)$$

Los datos: $1/v_0$ y $1/S_0$, de la curva de plasma sin inhibidor y con inhibidor a las dos concentraciones, se usaron para construir la representación gráfica de Lineweaver-Burk (Fig. 5.2A), en el cual se evidencia un típico efecto de inhibición competitiva. En la tabla 3, se representan las variaciones en k_m^{app} , los valores de V_{max}^{app} y las pendientes (m), productos del análisis de regresión que fueron utilizadas en las gráficas secundaria (Fig. 5.2B) para la estimación de la constante de inhibición K_i del modelo asumido (inhibición competitiva) de acuerdo con la ecuación (5.4).

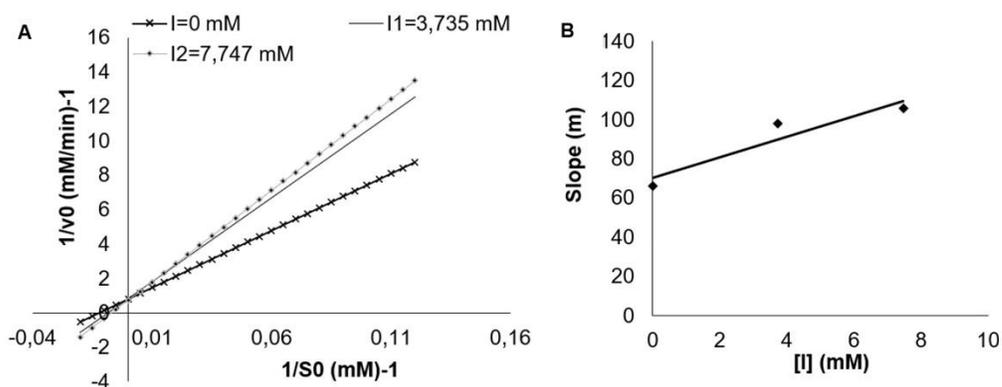


Fig. 5.2. A) Grafica de Lineweaver–Burk para los datos experimentales de hidrolizado de plasma bovino con Alcalasa a $T=60^\circ\text{C}$ y $\text{pH}=9.0$, sin inhibidor, con inhibidor ($I_1 = 3.735$ e $I_2 = 7.47$ mM); B) Grafica secundaria que representa la pendiente (m) de la curva Lineweaver–Burk para la estimación K_i .

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad (5.4)$$

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5.5)$$

$$m = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max} \cdot K_I} \cdot I \quad (5.6)$$

Tabla 5.3. Efecto de la adición de inhibidores al sistema de reacción plasma bovino Alcalasa sobre las constantes aparentes para el cálculo de constante de inhibición.

[I] (mM)	Pendiente (m)	K_m^{app} (mM)	V_{max}^{app} (mM/min)	K_m^{app}/V_{max}^{app}	K_I (mM)
0.000	66.284	82.432	1.277 ± 0.05	61.964	13.330
3.735	97.884	121.995		97.840	
7.470	1105.65	133.467		106.440	

5.3.3. Desactivación enzimática y definición de modelo global

El análisis de actividad residual de Alcalasa en el tiempo, sugiere que, en efecto, la enzima sufre una importante desactivación térmica, modulada positivamente por la presencia del sustrato en forma leve. La Fig. 5.4, muestra el ajuste del análisis de la actividad relativa de la enzima a una cinética de primer orden, para los dos casos: cuando la enzima está en medio acuoso no reaccionante y en presencia de sustrato de estudio, plasma bovino a 1 g/L.

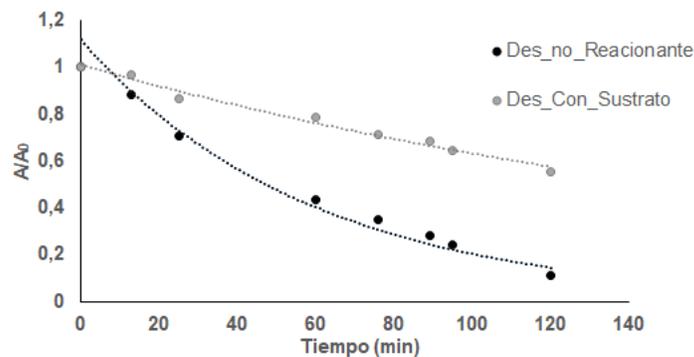


Fig. 5.3. Desactivación enzimática de Alcalasa 2.4 L con ajuste a cinética de primer orden en condiciones reaccionantes y en presencia de sustrato de hidrólisis a 1g/L.

Los parámetros cinéticos estimados, se usaron en la definición del modelo global que se muestra en la ecuación (5.7). El modelo contempla los efectos de inhibición por sustrato, inhibición competitiva de productos de hidrólisis y desactivación térmica de la Alcalasa en las condiciones constantes de pH y temperatura.

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{k_{cat} \cdot E_0 \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot S}{K_m \left[1 + \frac{P}{K_1}\right] + S \left[1 + \frac{S}{K_S}\right]} \quad (5.7)$$

El producto (P) se definió, calculado a través de los datos de concentración de enlaces α -aminos liberados tras la ruptura de cada enlace peptídico en un paso de hidrólisis. El sustrato son los enlaces restantes no fraccionados y la concentración de enzima inicial E_0 es la cantidad en gramos de producto enzimático por litro de solución en cada experimento.

Aunque las constantes catalíticas K_{cat} , de afinidad K_m , de desactivación de la enzima k_d , de inhibición por sustrato y producto K_s y K_i , son en realidad una función de la temperatura. En este capítulo, no se describen estos efectos, en tanto la finalidad del presente estudio, está enfocada en relacionar los efectos de inhibición con los parámetros cinéticos bajo diferentes E/S. La solución numérica de esta ecuación, se puede comparar con datos experimentales, para distintas relaciones E/S y analizar la bondad de ajuste.

5.3.3.1. Apuntes especiales del modelo cinético propuesto

Alcalasa tiene gran especificidad y selectividad, puesto que, es capaz de escindir en la cercanía de un amplio número de aminoácidos. En especial cuando Glu, Met, Leu, Tyr, Lys y Gln se ubican en la posición P1 del sitio catalítico (Rao et al., 1998). Los fenómenos externos como el papel del pH, la Temperatura, las concentraciones de sustrato y los efectos de inhibición, entre otros, conducen a pensar que, en definitiva, no todos los enlaces presentes en el sustrato son efectiva y realmente escindibles por la enzima. Un experimento prologando de hidrólisis sirvió de base para establecer que no más del 20% de los enlaces totales del plasma bovino se rompen en las condiciones de pH, T (constantes) y E/S (variables) evaluadas en el set de experimentos de validación. Es decir que de los 8.3 mmol/g de enlaces aminos totales del plasma, solo el 20% es susceptible de ser hidrolizado por Alcala en las condiciones dadas.

Esto significa que, el rango de concentración de enlaces iniciales (utilizados para la construcción de las curvas de ajuste) realmente hidrolizable es de 1.66-33.2 mM. Resulta conveniente utilizar estos valores de concentraciones reales y expresar las curvas con base a este análisis. En la Fig. 5.4 se representan las curvas de validación del modelo, utilizando la solución numérica de la ecuación (5.7), en una rutina programada en Matlab con los valores estimados de las constantes cinéticas contra datos experimentales de hidrólisis, realizadas a las condiciones descritas en la tabla 5.1.

En todos los casos, el modelo carece de capacidad para el ajuste de los datos, en todo el tiempo de reacción. Se puede analizar que existe cierto nivel de ajuste en la primera etapa de la hidrólisis. Esta capacidad del modelo para predecir la respuesta de los enlaces α -aminos liberados, es mejor, en cuanto menos sustrato inicial es usado en el sistema. Gráficamente es posible notar que, cuando el sustrato inicial es de 5g/L de proteína, el modelo predice con ajuste satisfactorio los primeros 30 minutos de reacción, tiempo desde el cual, empieza a sobreestimar los datos de productos generados. En contraste, cuando la concentración de sustrato inicial es de 20 g/L, el modelo solo ajusta para los primeros 5 minutos. Este comportamiento es exactamente el mismo para las concentraciones intermedias evaluadas (10 y 15 g/L) con tiempos aproximados de ajuste satisfactorio de 10 y 7 minutos respectivamente.

Cada vez que la enzima escinde un enlace peptídico, péptidos de naturaleza química variada se generan en el proceso. Cuando se registran cambios en el pH y la temperatura es común esperar

cambios en el mecanismo de acción enzimática, por motivos que fueron suficientemente explicadas en amplia literatura científica (Butré et al., 2015; Shi et al., 2005). Sin embargo, muy pocos trabajos científicos han abordado los cambios de estos mecanismos cuando se modifican las condiciones de sustrato inicial, manteniendo la relación E/S invariable. Una indicación de este cambio en el mecanismo se encontró en la hidrólisis de WPI por Alcalasa, donde la gráfica del porcentaje de proteínas intactas restantes contra el GH fue diferente para las distintas concentraciones de sustrato inicial (Deng, Butré, et al., 2018). Suponiendo que una de las razones de este cambio de perfil de productos se deba a fenómenos de inhibición enzimática, es de esperar que la ruta de producción de estos compuestos en cada nivel de sustrato de operación sea distinta y, en consecuencia, es altamente probable que péptidos heterogéneos presentes en concentraciones variadas, ejerzan efectos inhibitorios distintos. Los resultados de la distribución de pesos moleculares de los hidrolizados enzimáticos para diferentes concentraciones de sustrato inicial, en el tiempo de reacción, se muestran en la Fig. 5.5.

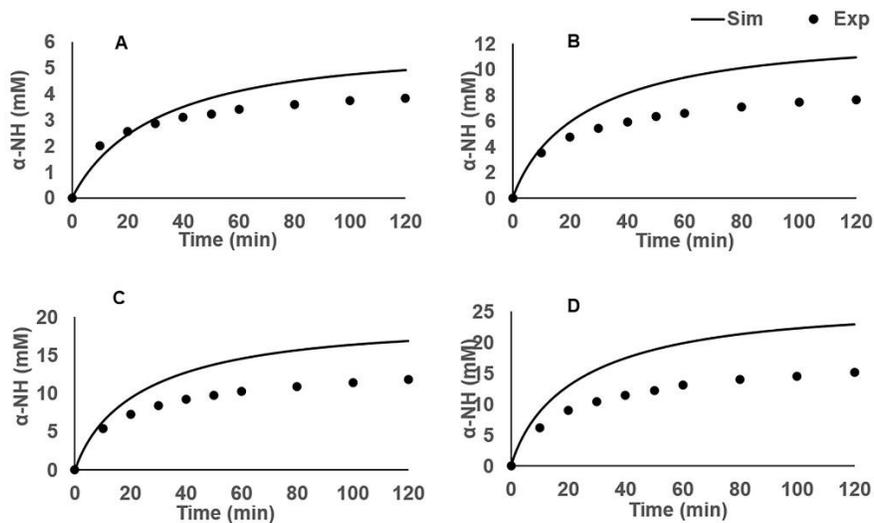


Fig. 5.4. Representación graficas de la validación del modelo propuesto para el caso en el que el parámetro de inhibición K_i es constante. Predicción del móldelo propuesto (línea continua). Datos experimentales (marcadores).

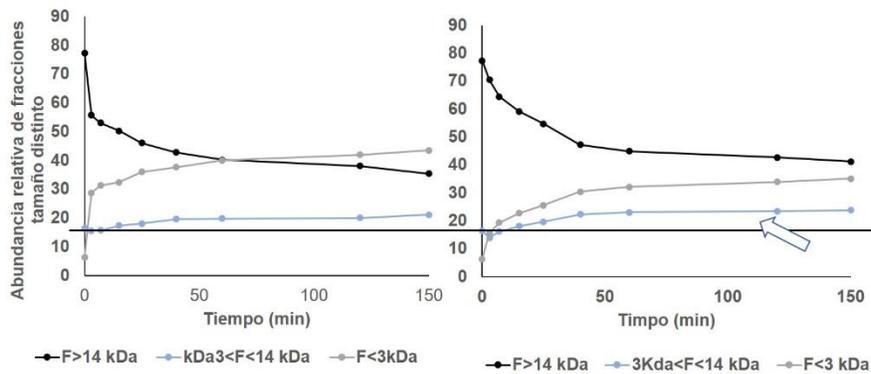


Fig. 5.5. Distribución de pesos moleculares Vs tiempo para distintos niveles de sustrato inicial S_0 . A) 5 g/L de sustrato y B) 20 g/L de sustrato

Los datos indican que una mayor velocidad de escisión de las fracciones de gran tamaño, compensada con una proporcional aparición de fracciones de tamaño pequeño, se evidencia cuando el sustrato inicial en la reacción es menor (Fig.5.5A con una carga de sustrato de 5 g/L), en comparación con la proporción estimada, cuando la carga de sustrato inicial es mayor (Fig.5.5B con una carga de sustrato de 20 g/L). En concordancia con los efectos de falta de ajuste del modelo, la proporción de productos de tamaño intermedia (3-14 kDa), es cada vez mayor en el sistema de reacción, a medida que el sustrato inicial de operación aumenta. En la práctica, estos productos de tamaño intermedio tienen mayor efecto inhibitorio sobre la reacción de hidrólisis de plasma-Alcalasa. Por lo cual, es altamente probable que este aumento de concentración genere los efectos de inhibición que, pueden ser la razón de la falta de ajuste del modelo en las fases consecutivas de la reacción. Esto implica que, un solo valor de la constante de inhibición K_i , puede no ser suficiente para explicar el fenómeno.

Valencia et al., (2014), ya había advertido que los fenómenos de inhibición por producto y la desactivación enzimática de la enzima más que el agotamiento de los enlaces susceptibles de hidrólisis explica la forma típica de la curva. Puesto que la variedad y cantidad productos generados en cada tiempo de reacción son distintos, es de esperar que la constante de inhibición sea distinta en cuanto la reacción avanza.

Una estrategia para la definición de una expresión variable de las contante K_i , reconoce que esta, tiene un cambio proporcional a la fracción de enlaces α -aminos relativos escindidos:

El Cambio de K_i es proporcional a: $\left(\frac{S_0-P}{S_0}\right)$.

A juzgar por los ajustes satisfactorios del modelo en la fase inicial de la reacción, K_i debe variar desde su valor inicial estimado, hasta un valor $\ll L_i \gg$ distinto para cada nivel de sustrato, debido a la variabilidad de inhibidores en la reacción, para cada concentración de sustrato evaluada. Lo cual significa que, el cambio es una función de la concentración de sustrato.

Luego entonces: $K_i = K_{i0} - (\text{Función Lineal de } S_0 \ll \beta \gg) \left(\frac{S_0-P}{S_0}\right)$

La función lineal ajustada con datos de distintas concentraciones de sustrato inicial, diferentes a los de validación es: $\beta = 0.07 * S_0 + 3.25$.

Esta ecuación auxiliar es utilizada en la expresión (5.7), para completar el modelo que supone los cambios de los valores de las constantes a medida que la reacción ocurre. Los resultados de la validación del modelo con los ajustes realizados se muestran en la Fig.5.6.

Los nuevos resultados indican que, el modelo, con las variaciones sugeridas en la constante de inhibición, es capaz de predecir muy bien los resultados experimentales en todo el tiempo de reacción, para las distintas condiciones de sustrato inicial evaluadas. En estas condiciones, los cambios de las constantes de inhibición para cada condición de operación evaluada, expresadas como un intervalo, respecto al valor inicial K_{i0} son: $S_0=5 \text{ g/L} [K_{i0} - 0.3K_{i0}]$; $S_0=10 \text{ g/L} [K_{i0} - 0.18K_{i0}]$; $S_0=15 \text{ g/L} [K_{i0} - 0.11K_{i0}]$ $S_0=20 \text{ g/L} [K_{i0} - 0.07K_{i0}]$.

La Fig. 5.7 muestra una representación del error en el ajuste, al mostrar la concentración de enlaces α -aminos predichos y los experimentales para cada condición de operación evaluada con su respectivo R^2 , superior en todos los casos a 0.95. Esto demuestra que un mayor efecto inhibitor parece ocurrir con elevadas concentraciones de sustrato. Tenga en cuenta que todas las ejecuciones experimentales se llevaron a cabo con la misma relación E/S. El plasma utilizado, es plasma dializado y como se demostró en el capítulo 4, los valores de GHs para las diferentes condiciones de sustrato inicial analizadas son los mismos para cada tiempo de reacción. Sin embargo, el perfil peptídico determinado en las fracciones ultrafiltradas (<3 KDa) con similares GH_{max} , es diferente. Se demostró además que muchos de estos péptidos encontrados en proporciones variadas en las distintas fracciones, tienen el potencial de inhibir la enzima convertidora de la angiotensina e importante potencial antioxidante.

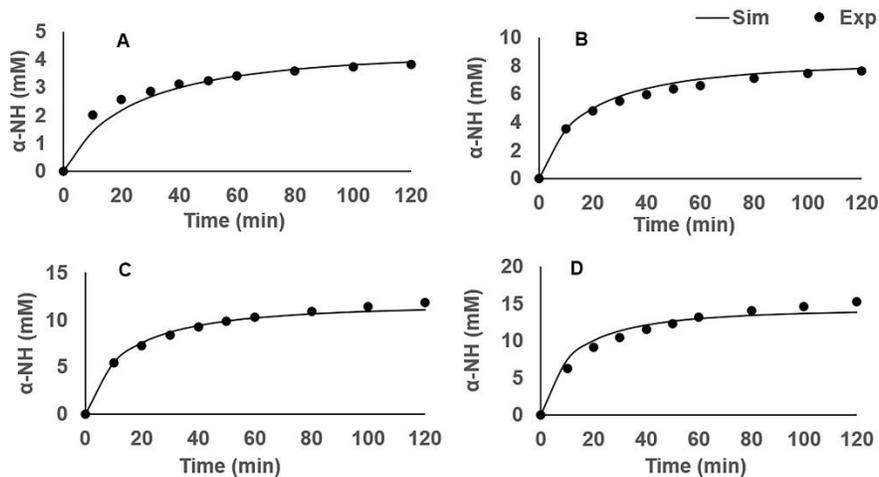


Fig. 5.6. Representación gráfica de la validación del modelo propuesto para el caso en el que el parámetro de inhibición K_i es una función de la ruptura de enlaces. Predicción del modelo propuesto (línea continua). Datos experimentales (marcadores). Para las diferentes condiciones iniciales de sustrato: $S_0=5, 10, 15$ y 20 g/L

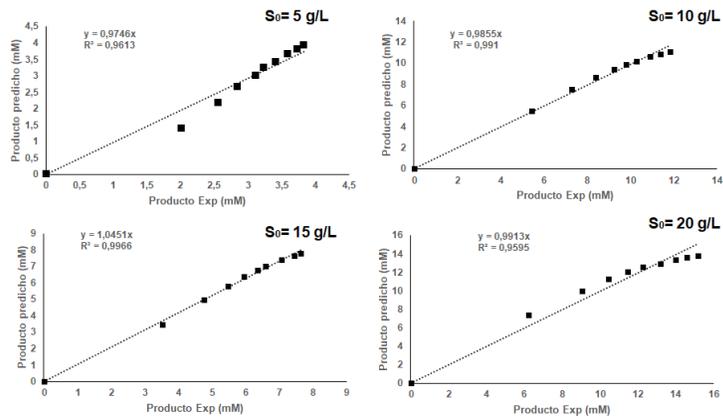


Fig. 9. Grafica de error para de los valores predichos por el modelo y los datos experimentales en las diferentes condiciones iniciales de sustrato: S₀=5,10,15 y 20 g/L.

Tabla 5.4. Péptidos con actividad biológica: Inhibición de la ACE (IECA) y antioxidantes (AOXI), obtenidos en fracciones hidrolizadas menores de 3<Kda, con GH_S_{max} a las diferentes concentraciones iniciales evaluadas: F1, F2, F3, y F4 (S₀= 5,110,15 y 20 g/L respectivamente).

Secuencias Encontrada	Capacidad Inhibición de ECA (SVM)	Capacidad Antioxidante (AOXI) (probabilidad)	Fracción de Origen	Abundancia Relativa en cada fracción (%)
VSLPEVPGEY	Si (2.48)	Si (0.97)	F5	0.53
GEVLPLPEANFPSF	Si (2.02)	Si (0.95)	F5	0.04
LRPVPPISGGGY	Si (1.79)	Si (0.93)	F10 F15 F20	0.30 0.30 1.09
VSFTLPRSPTSQE	Si (2.32)	Si (0.51)	F5	0.31
YNPDIHKVK	Si (2.77)	No (0.37)	F10 F15	0.03 0.03
LSGQLPSPSKPVPF	Si (1.85)	Si (0.97)	F5 F10 F15 F20	0.15 0.81 0.81 1.04
SPDLEPVLRY	Si (1.79)	Si (0.75)	F5 F10 F15 F20	0.02 0.03 0.03 1.04
EAPSLRPVPPISGGGY	Si (1.71)	Si (0.71)	F20	2.8

El potencial bioactivo: Inhibición de la ACE (IECA) y antioxidantes (AOXI), fue evaluado con herramientas disponibles en línea, luego de la purificación e identificación de fracciones peptídicas con peso molecular <3 kDa, como se muestra en el Capítulo 4. Para la actividad IECA se utilizó AHTpin (<https://webs.iitd.edu.in/raghava/ahtpin/help.php>), creada como un espacio virtual,

basado en aprendizaje automático, en la cual se puede predecir, diseñar y evaluar péptidos antihipertensivos (Kumar et al., 2015). Mientras que para la capacidad AOXI de utilizó el meta predictor basado en secuencias, mAHTPred (<http://thegleelab.org/mAHTPred>), el cual se basa en algoritmos de aprendizaje automático, incluida la máquina de vectores de soporte en el desarrollo de modelo de predicción de péptidos antihipertensivos (Manavalan et al., 2018).

Los resultados muestran que evidentemente, de las cuatro fracciones, derivan péptidos con importante potencial bioactivo. En el caso de los péptidos con capacidad de IECA elevada se potencia en las fracciones obtenida con 5 g/L iniciales, pero una abundancia relativa superior posee otros péptidos menos activos en las fracciones con mayor carga, como las obtenidas de 20 g/L de sustrato inicial. Se sugiere que a pesar de poseer o no actividad bioactiva asociada a cada secuencia, estos péptidos pueden ejercer efectos de inhibición a las reacciones de hidrólisis con Alcalasa.

5.4. CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que el modelo que explica la hidrólisis enzimática de proteínas de plasma bovino con Alcalasa, contempla los efectos conjuntos de inhibición por sustrato, competitiva por producto y desactivación térmica de la enzima, modulada positivamente por la presencia del sustrato. El efecto de la inhibición de los productos de hidrólisis es muy importante en el ajuste del comportamiento experimental. Las fracciones de peso molecular intermedio tienen un gran efecto de inhibición sobre la enzima. Este efecto es diferente en cada condición de sustrato inicial (S_0) evaluada, siempre que se conserva la relación (E/S) en el sistema. Un mayor efecto inhibitorio debido a los productos, se presenta cuando la reacción ocurre con una mayor carga de sustrato inicial ($S_0=20$ g/L). Para una relación (E/S) fija, las constantes de inhibición tienen relación con la conversión del sustrato, esto se explica porque péptidos de naturaleza fisicoquímica variada aparecen y desaparecen en el tiempo a medida que la reacción avanza, hasta lograr un conjunto de péptidos distintos y en concentraciones relativas también variadas, para cada nivel de sustrato usado. Esta comunidad de péptidos ejerce distinta acción inhibitoria frente a la enzima en cada condición de operación.

REFERENCIAS

- Adamson, N. J., & Reynolds, E. C. (1996). Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity. *Enzyme and Microbial Technology*, *19*(3), 202–207. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00232-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00232-4)
- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food Chemistry*, *136*(3–4), 1435–1443. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.09.053>
- Beaubier, S., Framboisier, X., Fournier, F., Galet, O., & Kapel, R. (2021). A new approach for modelling and optimizing batch enzymatic proteolysis. *Chemical Engineering Journal*, *405*, 126871. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126871>
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2020). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *26*(1), 139–150. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
- Butré, C. I., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2014). Determination of the influence of substrate concentration on enzyme selectivity using whey protein isolate and bacillus licheniformis protease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(42), 10230–10239. <https://doi.org/10.1021/jf503151f>
- Butré, C. I., Sforza, S., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2015). Determination of the influence of the pH of hydrolysis on enzyme selectivity of Bacillus licheniformis protease towards whey protein isolate. *International Dairy Journal*, *44*, 44–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.12.007>
- Demirhan, E., Apar, D. K., & Özbek, B. (2011). A Kinetic Study on Sesame Cake Protein Hydrolysis by Alcalase. *Journal of Food Science*, *76*(1), C64–C67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01938.x>
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, *86*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.06.018>
- Deng, Y., van der Veer, F., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2018). Towards predicting protein hydrolysis by bovine trypsin. *Process Biochemistry*, *65*, 81–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.006>
- González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P., & Guadix, E. M. (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins: {I}. {Kinetic} models. *Biotechnology and Bioengineering*, *44*(4), 523–528. <https://doi.org/10.1002/bit.260440415>
- He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, *50*(1), 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.031>
- Henning, A. K., Groschup, M. H., Mettenleiter, T. C., & Karger, A. (2014). Analysis of the bovine plasma proteome by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight tandem mass spectrometry. *The Veterinary Journal*, *199*(1), 175–180. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2013.10.029>
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, *36*(1), 131–139. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00195-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00195-3)
- Kumar, R., Chaudhary, K., Singh Chauhan, J., Nagpal, G., Kumar, R., Sharma, M., & Raghava, G. P. S. (2015). An in silico platform for predicting, screening and designing of antihypertensive peptides. *Scientific Reports*, *5*(1), 12512. <https://doi.org/10.1038/srep12512>

- Manavalan, B., Basith, S., Shin, T. H., Wei, L., & Lee, G. (2018). mAHTPred: a sequence-based meta-predictor for improving the prediction of anti-hypertensive peptides using effective feature representation. *Bioinformatics*, *35*(16), 2757–2765. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1047>
- Márquez, M. C., & Vázquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, *35*(1–2), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00041-2)
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: {Mechanism} and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, *1*(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *62*(3), 597–635. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.597-635.1998>
- Rubio, F. C., Tello, P. G., Cuadrado, V. F., Dueñas, M. P., & Moreno, M. C. M. (1993). Hidrólisis de caseína con alcalasa. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *33*(1), 59–70. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=717188>
- Shi, D., He, Z., & Qi, W. (2005). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, *40*(5), 1943–1949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>
- Sousa, J., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F., & Giordano, R. C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *21*(2), 147–153.
- Sousa Jr, R., Lopes, G. P., Tardioli, P. W., Giordano, R. L. C., Almeida, P. I. F., & Giordano, R. C. (2004). Kinetic model for whey protein hydrolysis by alcalase multipoint-immobilized on agarose gel particles. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *21*, 147–153. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322004000200003>
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 2143–2196. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.060>
- Trusek-Holownia, A. (2008). Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal*, *39*(2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.010>
- Trusek-Holownia, Anna, & Noworyta, A. (2015). A model of kinetics of the enzymatic hydrolysis of biopolymers – a concept for determination of hydrolysate composition. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *89*, 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2015.01.008>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014a). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, *49*(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014b). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, *49*(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Winters, A. L., & Minchin, F. R. (2005). Modification of the Lowry assay to measure proteins and phenols in covalently bound complexes. *Analytical Biochemistry*, *346*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2005.07.041>

CAPÍTULO 6. LOS MODELOS DE POBLACIÓN APLICADOS AL ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES EN LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS

RESUMEN

En este capítulo, se presenta una estrategia innovadora para abordar los problemas de equilibrio poblacional inverso, específicamente en el contexto de la hidrólisis enzimática de una proteína. Para ello, se utilizaron modelos de balance de población (MBP) que han demostrado ser efectivos para describir la dinámica espacio-temporal de las poblaciones. La metodología propuesta se basa en la definición de un modelo de población para la degradación enzimática de una proteína, utilizando datos experimentales obtenidos de la distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de BSA bovino. Estos datos de concentración de componentes agrupados se obtuvieron a través del análisis de cromatografía líquida por exclusión. La información necesaria para este estudio proviene principalmente de dos fuentes: en primer lugar, se recurrió a datos disponibles en la literatura científica, y en segundo lugar, se llevó a cabo una rutina experimental para estimar las distribuciones de pesos, las cuales se compararon con los resultados del modelo propuesto. El modelo desarrollado describe la evolución temporal de la distribución completa de pesos moleculares de los hidrolizados de proteínas bajo ciertas condiciones de operación, como la temperatura y la concentración inicial de sustrato (S_0). Para resolver las ecuaciones de este modelo, se aplicó una variante del Método Extendido de los Momentos (EMOM). El primer paso de este método implica transformar la ecuación de equilibrio de población en una ecuación de momentos. La premisa fundamental de este modelo es que la tasa de ruptura de elementos con una coordinada interna específica (expresada como pesos moleculares en kDa) es proporcional al número de tales elementos presentes. Se encontró que el modelo se ajusta bastante bien a los datos experimentales de la distribución de pesos moleculares en las escisiones de BSA con Alcalasa y tripsina, con errores porcentuales del orden del 15%. Estos resultados indican que este enfoque tiene el potencial de ser una herramienta valiosa en el estudio de la obtención de péptidos bioactivos a través de procesos de degradación enzimática de proteínas.

Palabras clave: Modelamiento matemático; modelos de población; métodos de los momentos

6.1. INTRODUCCIÓN

Se ha comprobado que es posible obtener péptidos bioactivos a través de la hidrólisis enzimática de distintas fuentes de proteínas (Sánchez & Vázquez, 2017). Estas actividades biológicas son muchas (Bhandari et al., 2020) y como consecuencia de esto resulta de gran valor, comprender muchos de los aspectos asociados con los fenómenos implícitos en la reacción, para poder controlarla.

Tal vez, la herramienta más acertada para la comprensión de la dinámica de la hidrólisis enzimática de proteína, es el modelado matemático a través del uso de datos experimentales. Las reacciones de hidrólisis de proteínas presentan una diferencia sustancial con la hidrólisis de homopolímeros, los cuales, se caracterizan por tener una secuencia monomérica repetida (Muñoz-Tamayo et al., 2012). Las proteínas en cambio, combinan 20 aminoácidos al azar en cadenas, estructural y químicamente diversas (Anna Trusek-Holownia & Noworyta, 2015). Esto hace que sea compleja la comprensión plena de los fenómenos cinéticos, puesto que coexisten múltiples componentes, al tiempo que, ocurren las reacciones. Incluso, un componente puede configurarse como un producto, en un momento de la reacción y en otra fase puede ser un sustrato (Shi et al., 2005). Por esta razón, es difícil lograr flexibilidad en la fijación de datos experimentales en la cinética de estas reacciones, conservando simplicidad en la definición de modelos matemáticos, el ajuste de datos y la identificación de parámetros (Fernández & Riera, 2013).

En el capítulo 1, se ha proporcionado una razonable revisión de los avances notables en el modelamiento de las reacciones de hidrólisis enzimática de proteínas. El enfoque más frecuente para el modelamiento de estas reacciones admite el análisis de la ecuación de Michaelis-Menten, la cual, se ha utilizado para diferentes enzimas y fuentes de proteínas (Barros & Xavier Malcata, 2004; A Trusek-Holownia, 2008). El análisis de Valencia et al., (2015), resulta relevante, en la medida en que, propone que, la concentración de enlace peptídicos es en realidad, el sustrato y la concentración de grupos α -amino liberados durante la reacción, son los productos. Esto establece una alternativa para el ajuste de datos experimentales, sin emplear el concepto de GH, utilizado ampliamente como criterio para evaluar el avance de estas reacciones (Marquez Moreno & Fernandez Cuadrado, 1993; Qi & He, 2006). El GH puede ser una variable limitante, si el objetivo es analizar lo que en realidad ocurre en la reacción y conducirla hacia la obtención de péptidos de interés. A propósito, son de interés los modelos cinéticos basados en la formación dinámica y la degradación de péptidos derivados de las reacciones, como el propuesto por Fernández & Riera, (2013). Sin embargo, este método sugiere la determinación de gran número de constantes (en este caso 14). Además, el abordaje experimental, en muchos casos, es muy complejo, particularmente para proteínas de mayor peso molecular (Anna Trusek-Holownia & Noworyta, 2015), sumado a la gran demanda técnica que implican identificaciones sucesivas para la definición de las constantes y el uso del modelo en otros contextos.

Shi et al., (2005), usaron un método de agrupamiento en el estudio del proceso de hidrólisis triptica de BSA. El método combina grupos de componentes que tienen comportamientos cinéticos similares en varios bloques (fracciones peptídicas con pesos moleculares en un rango definido) con el fin de reducir el número de variables y parámetros, simplificando de esta forma el complicado sistema. Esta técnica es ampliamente empleada en la industria petroquímica. Los resultados

encontrados, mostraron que, el modelo cinético podría predecir la distribución de la concentración de masa de los productos en distintos rangos de tamaño, con errores bajos, pero el número de parámetros es superior al número de ecuaciones, lo cual dificulta su estimación y hace necesario un paso de verificación de sensibilidad que no fue propuesto en este modelo. Esta estrategia permite una mayor comprensión de los mecanismos cinéticos, en comparación con la información obtenida a través del GH, entre tanto proporciona más datos acerca de los productos.

Cuando se hidroliza una proteína en una reacción homogénea, rupturas sucesivas ocurren en solución. Sin las restricciones difusionales externas, la enzima se adsorbe en el sustrato, en la posición específica de escisión, conformando un complejo enzima-sustrato. En este momento, se rompe un enlace peptídico con la liberación de una molécula de agua. A continuación, la enzima se libera e inicia el ciclo de reacciones sucesivas, bien con la molécula proteica inicial o con sitios de afinidad expuestos en los productos liberados (péptidos). La enzima también sufre procesos de inhibición con algunos de los productos y se desactiva en el tiempo. De acuerdo con la teoría de Linderstrom-Lang, para el caso de las reacciones de hidrólisis de proteínas globulares, se describen dos posibles mecanismos de reacción: one by one (uno a uno) y zipper (cremallera). Para un GH dado, la porción de proteína intacta (estructura proteica sin fraccionar) debe ser menor para una reacción que sigue el mecanismo one-by-one que, en uno que sigue el mecanismo Zipper (Deng et al., 2018). Esto significa que, una reacción típica la enzima tiene una distribución de sustratos y con cada escisión forma un producto que se convierte a su vez en un potencial sustrato. Esto sugiere la escisión de proteínas por acción de enzima es un fenómeno de población descrito por muchos péptidos de diferentes tamaños moleculares en comunidad.

La dinámica espacio-temporal de las poblaciones se describe muy bien a través de los modelos de balance de población (MBP). Los cuales son modelos de ecuaciones diferenciales parciales aplicables a una gran número de fenómenos fisicoquímicos y también biológicos (Inguva et al., 2022). Estos enfoques, son especialmente utilizados en estrategias de modelamiento de sistemas concentrados en el análisis dinámico de cambios en la distribución de partículas en función de condiciones operativas (Ramkrishna, 2000). Estos modelos se han usado con éxito para estudiar la degradación de polímeros en solución (Kostoglou, 2000). Los MBP fueron empleados para desarrollar un modelo mecánico que estudia la acción de la endoglucanasa sobre la celulosa (Hosseini & Shah, 2011b) y un modelo la acción conjunta de endoglucanasa y la exoglucanasa que implica un análisis de la hidrólisis de la celulosa en la superficie y en el interior de la partícula (Hosseini & Shah, 2011a). Bajo este enfoque, se ha pensado que es posible analizar los cambios en el tiempo de todo el espectro de distribución de pesos moleculares, desde el polímero con mayor grado de polimerización (para nuestro caso la proteína intacta) hasta las unidades monoméricas más sencillas y sus estructuras intermedias (polipéptidos producto de la ruptura de la cadena proteica). Lo cual, permite calcular propiedades importantes relacionadas con el momento de la distribución del polímero: los pesos moleculares promedios en número y en peso, etc. (Ho et al., 2018).

No encontramos en la literatura científica una referencia al uso de los MBP para el análisis de las reacciones de hidrólisis enzimática de proteínas. Se ha propuesto, por lo tanto, utilizar la estrategia de solución de problemas de equilibrio poblacional inverso (Ramkrishna, 2000), en la definición de un modelo de población para la degradación enzimática de una proteína, usando información

experimental de distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de BSA bovino. Los datos de concentración de componentes agrupados se obtuvieron del análisis de cromatografía líquida por exclusión. Este modelo se ha propuesto, de modo que sea especialmente útil para el análisis de la evolución temporal de la distribución completa de pesos moleculares de hidrolizados de proteína de acuerdo con algunas condiciones de operación. Brindando una alternativa al tradicional enfoque cinético en el modelamiento de la escisión enzimática de proteínas, el cual, utiliza el análisis de ecuaciones tipo Michaelis-Menten. El conocimiento sobre la distribución temporal de los pesos moleculares puede proporcionar una alternativa factible para evaluar aspectos técnicos de la producción de fracciones peptídicas de interés bioactivo, como la antioxidante, por ejemplo.

6.2. DESCRIPCIÓN DEL MODELO

6.2.1 Aspectos teóricos de MBP general

La ecuación de balance de población puede realizar una descripción de cómo evoluciona una función de densidad de una población dada de “partículas” que están sometidas a un proceso, por el cual, está experimentando cambios. En el caso específico de las reacciones de hidrólisis de proteínas, las enzimas (Endo proteinasas) escinden en posiciones al azar de la cadena proteica (CP) y la fragmentan. Considérese " v " como la coordenada interna (descrita como el peso molecular). La ecuación global que rige un fenómeno distribuido es (6.1):

$$\frac{\partial n(v;t)}{\partial t} + \underbrace{\frac{\partial}{\partial v} [G(v)f(v;t)]}_{\text{Velocidad de crecimiento}} - B(v;t) + D(v;t) = 0 \quad (6.1)$$

En donde $n(v;t)$ se refiere a la densidad de “partículas”, $G(v)$ es la tasa de crecimiento, $B(v;t) + D(v;t)$ son términos de nacimiento y muerte respectivamente. Estos mecanismos pueden ocurrir por tres fenómenos: Nucleación, agregación y ruptura (6.2-6.3)

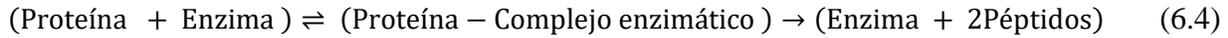
$$B = \underbrace{\delta(v)B_0}_{\text{Nucleación}} + \underbrace{\frac{1}{2} \int_0^v a(v-v',v') n(v-v') f(v') dv'}_{\text{Agregación}} + \underbrace{\int_v^\infty S(v') \omega(v|v') n(v') dv'}_{\text{Ruptura}} \quad (6.2)$$

$$D = \underbrace{f(v) \int_0^\infty a(v,v') n(v') dv'}_{\text{Agregación}} + \underbrace{S(v)n(v)}_{\text{Ruptura}} \quad (6.3)$$

6.2.2 El MBP en el contexto de la reacción de hidrólisis de proteínas

Como se ha mencionado y demostrado en capítulos anteriores, la hidrólisis enzimática de proteínas está fuertemente influenciada por múltiples factores. Muchos de los cuales incluso están interrelacionados. Hosseini & Shah, (2011b) realizan una descripción de los pasos en un proceso de hidrólisis enzimática de celulosa, los cuales se ajustan en cierta forma a los pasos globales de la hidrólisis de proteínas. Las proteínas se caracterizan por ser moléculas solubles en agua, medio clásico en donde se desarrollan procesos de aprovechamiento de hidrolizados enzimáticos.

En solución homogénea y sin las restricciones difusionales externas, la enzima se difunde casi instantáneamente en el sustrato proteico, para formar el complejo enzima-sustrato. En un segundo paso, la enzima se libera, generando dos productos (6.4).



Este modelo se enfoca en la fase de la reacción y considera un sistema perfectamente homogéneo, como efectivamente lo suponen la mayoría de los modelos que estudian las reacciones de hidrólisis de proteínas, con excepción de los casos, en donde, la enzima se encuentra inmovilizada, lo cual, hace necesario el análisis de la difusión del sustrato por el soporte poroso hasta la enzima.

Los procesos de agregación y nucleación no son tenidos en cuenta en este modelo. En una reacción de hidrólisis típica es posible que se descubran grupos hidrofóbicos o sulfhidrilos ubicados en el interior de las estructuras proteicas. Altas temperaturas pueden inducir efectos de interacción en estos grupos, produciendo agregados (Zhao et al., 2011). Pero en las condiciones de pH y Temperatura de operación típicos para estudios de modelamiento de estos fenómenos, la agregación proteica es significativamente menos relevante que la reacción de ruptura. Análisis de solubilidad proteica se pueden efectuar para asegurar el poco impacto de estos efectos en la reacción (Butré et al., 2012).

En el mecanismo general simplificado, en cada ataque, la enzima, una endoproteasa con variada especificidad, escinde un lugar al azar en la cadena:



En donde P(i) es el polímero inicial (sustrato sujeto de cada ataque enzimático individual), compuesto por (i= N hasta 2). Sea N el número total de unidades monoméricas del polímero (proteína). E y EP(i), son la enzima y el complejo enzima-sustrato respectivamente. Las constantes catalíticas se numeran en cada fase. En este caso, P(1) son las unidades peptídicas formadas, cada una de ellas con n unidades monoméricas, no determinadas para relacionadas con un tamaño. Luego, cada ruptura produce la formación de unidades intermedias de tamaños moleculares no uniformes.

En estas circunstancias, la ecuación de balance de población continua para un sistema clásico de despolimerización con coordenada interna no uniforme y enteramente homogénea es:

$$\frac{\partial n(v,t)}{\partial t} = B - D \quad (6.6)$$

Los términos de muerte (D) y nacimiento (B) por ruptura son:

$$D = S(v)n(v, t) \quad (6.7)$$

$$B = \int_v^{\infty} \omega(v|v')S(v')n(v', t)dv' \quad (6.8)$$

Por lo tanto, el balance es:

$$\frac{\partial n(v,t)}{\partial t} = \int_v^{\infty} \omega(v|v')S(v')n(v', t)dv' - S(v)n(v, t) \quad (6.9)$$

La suposición fundamental de este modelo es que la tasa de ruptura de elementos con coordenada interna v es proporcional el número de dichos elementos (6.7). En este caso D es la tasa de desaparición de elementos con coordenada interna v debido a la ruptura. $S(v)$ es conocida como la frecuencia de ruptura y puede depender de v y de las condiciones experimentales, y $n(v, t)$ es la función densidad de distribución para los elementos de coordenada interna v en un instante de tiempo t .

Por otro lado, B se conoce como la tasa de aparición de elementos de coordenada interna v y está dada por todos los posibles eventos de ruptura de los elementos con coordenada interna mayor que v (6.8) (Ramkrishna, 2000).

$\omega(v|v')$ es la función de distribución de fragmentos (Marchisio et al., 2003). La cantidad $\omega(v|v')dv'$ representa el número de elementos de coordenada interna v formados a partir de la ruptura de elementos de coordenada interna v' .

Las expresiones para $\omega(v|v')$ y $S(v)$ son difíciles de determinar y dependen fuertemente de la naturaleza del proceso a modelar. Varios trabajos (McCoy & Wang, 1994; PINAR et al., 2015) sugieren que para ruptura binaria la función tiene la forma (6.10) generalizada. En este caso k_{ω} puede estar relacionada con las condiciones de operación.

$$\omega(v|v') = \frac{k_{\omega}}{v'} \quad (6.10)$$

Mientras que por otro lado, la frecuencia de ruptura tiene la forma general (Ramkrishna & Mahoney, 2002) de la ecuación (6.11).

$$S(v) = Kv^{\alpha} \quad (6.11)$$

Donde K y α son parámetros positivos que indican que la tasa de ruptura de los elementos más grandes es mayor que la de los más pequeños.

En las reacciones de hidrólisis enzimática de proteínas el efecto de inhibición de los productos finales y la desactivación enzimática, son ampliamente conocidos, como los factores más importantes que afectan la tasa de hidrólisis. Esto ocasiona una disminución progresiva de la conversión a medida que la reacción avanza. En el capítulo 5, se discutieron algunos de estos aspectos y se recabó evidencia para comprobar sus efectos, para el caso de plasma bovino entero (60% BSA). En estas circunstancias, la frecuencia de ruptura se relaciona con una constante de inhibición-desactivación K_{id} en la forma: $S(v) = S(v)_0 * K_{id}$.

El fenómeno aquí estudiado, incluye el análisis de la frecuencia de ruptura en dos intervalos, es decir, en la ruptura, los elementos pertenecientes al intervalo $[0, v']$ obedecen a la función de distribución de fragmentos y una frecuencia de ruptura diferentes a las de los elementos pertenecientes al intervalo $[v', \infty)$. Por lo tanto, la función de distribución de fragmentos en este caso se puede expresar como la ecuación (6.12).

$$\omega(v|v') = \frac{k_{\omega 1}}{v'}, 0 \leq v < \frac{k_{\omega 2}}{v'}, v > v^* \quad (6.12)$$

Donde $k_{\omega 1}$ es una constante asociada a la ruptura de los elementos pertenecientes al intervalo $[0, v']$, mientras que $k_{\omega 2}$ es una constante asociada a la ruptura de los elementos pertenecientes al intervalo $[v', \infty)$. Mientras que, para la frecuencia de ruptura se tiene una expresión de la forma de la ecuación (6.13).

$$S(v) = K_1 v^{\alpha 1}, 0 \leq v < v^* K_2 v^{\alpha 2}, v \geq v^* \quad (6.13)$$

Donde K_1 y K_2 son constantes de la frecuencia de ruptura, dependientes de las condiciones experimentales asociadas a los intervalos $[0, v']$ y $[v', \infty)$, respectivamente.

De manera similar, el número promedio de partículas producidas a partir de la ruptura de v' , esta dado por la ecuación (6.14).

$$\bar{u} = \{\bar{u}_1, 0 \leq v' \bar{u}_2, v \geq v'\} \quad (6.14)$$

Aquí, \bar{u}_1 es el número promedio de partículas producidas a partir de la ruptura de v' en el intervalo $[0, v']$ y \bar{u}_2 es el número promedio de partículas producidas a partir de la ruptura de v' en el intervalo $[v', \infty)$.

6.3. SOLUCIÓN DEL MBP POR EL MÉTODO DE LOS MOMENTOS

Para la mayoría de las soluciones de los MBP, suelen emplearse métodos numéricos, puesto que, las soluciones analíticas solo son posible para casos especiales. Existen muchos métodos para estas soluciones, los cuales presentan una serie de ventajas y desventajas (Falola et al., 2013).

Para resolver las ecuaciones de este modelo, se usó una variación del denominado: Método Extendido de los Momentos (Falola, Borissova, & Wang, 2013) (EMOM por sus siglas en inglés). El primer paso de este método consiste en transformar la ecuación (6.6) (ecuaciones de balance de población) en una ecuación de momentos, multiplicándola por v^k e integrado desde 0 hasta ∞ . De esta manera, teniendo en cuenta los fenómenos de ruptura pura, se obtiene la expresión (6.15).

$$\frac{dM_k}{dt} + \int_0^\infty v^k (D - B) dv = 0 \quad (6.15)$$

Donde M_k es el momento k de la distribución y está expresado por la ecuación (6.16)

$$M_k = \int_0^{\infty} v^k n dv \quad (6.16)$$

Remplazando la ecuación (6.9) en la ecuación (6.15), tenemos (6.17).

$$\frac{dM_k}{dt} + \int_0^{\infty} v^k S(v) n(v, t) dv - \bar{u} \int_0^{\infty} S(v') \left(\int_0^{\infty} v^k \omega(v, v') dv \right) n(v', t) dv' = 0 \quad (6.17)$$

El siguiente paso, consiste en discretizar los momentos de la distribución, para lo cual, se realizó una expansión de segundo orden (6.18).

$$M_k = \sum_{i=1}^N \frac{n_i v_i^k + n_{i+1} v_{i+1}^k}{2} \Delta v \quad (6.18)$$

Con $k = 1, 2, 3 \dots N$

Donde n_i es el valor de la función distribución en el punto medio v_i del intervalo de tamaño Δv .

Luego, a partir de los primeros N momentos es posible calcular los valores de n_i resolviendo el sistema de ecuaciones (6.19).

$$\left[v_1^1 \frac{\Delta v}{2} v_2^1 \dots v_{N-1}^1 \Delta v v_N^1 \frac{\Delta v}{2} v_1^2 \frac{\Delta v}{2} \dots v_1^{N-1} \frac{\Delta v}{2} \dots v_1^N \frac{\Delta v}{2} \dots v_N^N \frac{\Delta v}{2} \right] \times [n_1 n_1 \dots] \quad (6.19)$$

El sistema de ecuaciones diferenciales resultante es altamente mal condicionado, por lo cual en este software se realizó un proceso de regularización mediante la rutina pseudo-inversa de Matlab. Esta rutina hace cero todos los valores singulares que son menores a una tolerancia definida. Después de conocer los valores de n_i , las ecuaciones integro-diferenciales de momentos se pueden integrar usando la regla del trapecio.

El término de muerte en la ruptura se calcula como (6.20).

$$\int_0^{\infty} v^k S(v) n(v, t) dv \approx \frac{\Delta v}{2} (v_1^k S_1 n_1 + v_N^k S_N n_N + 2 \sum_{i=2}^{N-1} v_i^k S_i n_i) \quad (6.20)$$

Mientras que, el término de nacimiento debido a la ruptura está dado por la expresión (6.21).

$$\bar{u} \int_0^{\infty} S(v') \left(\int_0^{\infty} v^k \omega(v, v') dv \right) n(v', t) dv = \bar{u} \frac{\Delta v}{2} \left(S_1 h_1^{(k)} n_1 + S_N h_N^{(k)} n_N + 2 \sum_{i=2}^{N-1} S_i h_i^{(k)} n_i \right) \quad (6.21)$$

En cualquier caso h_i esta dado por (6.22)

$$h_i = \int_0^{\infty} v^k \omega(v, v') dv \quad (6.22)$$

El sistema se resuelve para el intervalo de tiempo definido en cada reacción de validación. 90 y 110 minutos para BSA-tripsina a distintas temperaturas (datos tomados de la literatura) y 120 min

para BSA-Alcalasa (datos propios).

6.4. VALIDACIÓN DEL MODELO

Para la validación del modelo propuesto, se establecieron dos estrategias a seguir. Primero se tomó información disponible en la literatura científica y en una segunda instancia, se estableció una rutina experimental, con la cual, se estimaron las distribuciones de pesos para comparar con los resultados del modelo.

6.4.1 Validación de distribución de pesos moleculares para hidrolizados de BSA-tripsina y BSA-Alcalasa.

Se tomaron, datos de distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de BSA bovina con tripsina, expresados como concentración (mg/mL) de cada componente, distribuidas en pesos moleculares en el rango de 0,3-127 kDa. La información está disponibles en trabajo de Shi et al., (2005). En la Fig. 6.1, se muestra un esquema del proceso llevado a cabo por los autores para la toma de datos experimentales. Los ensayos, utilizados para la validación de su modelo se realizaron a varias temperaturas comprendidas entre 30-60 °C.

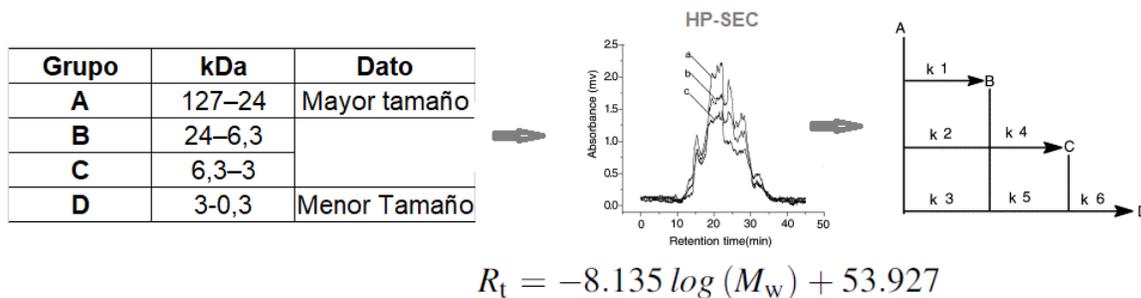


Fig. 6.1. Estrategia de análisis propuesta por Shi et al., (2005) en la determinación experimental de pesos moleculares (kDa) de la hidrolizados enzimáticos de BSA-tripsina, por cromatografía por exclusión por tamaños (HP-SEC), aplicando una estrategia de agrupamiento con fracciones en tamaños moleculares en rangos definidos.

La representación de la capacidad del modelo para predecir la distribución de pesos moleculares a través del tiempo, para distintas temperaturas se puede apreciar en la Fig. 6.2. En el eje x, se grafica el promedio de pesos moleculares que es la variable distribuida del modelo (v) expresada en kDa, enfrentada con los datos experimentales obtenidos para los distintos tiempos de hidrólisis de BSA-tripsina. Los datos experimentales de cada uno de los grupos son representados en la figura con los promedios de pesos moleculares de cada grupo. El modelo predice bastante bien los datos de la distribución con porcentajes de errores del orden de 15% con respecto a los datos experimentales.

Para la validación de la distribución de pesos moleculares estimados por el modelo en nuestro problema de estudio (hidrólisis de BSA con Alcalasa), se tomó la información disponible de distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de BSA a $S_0=5$ g/L y una cantidad

de enzima proporcional al sustrato E:S=1:50.

Alícuotas de 1 mL se retiraron del sistema de hidrólisis enzimática de BSA-Alcalasa 2.9L a diferentes tiempos (15, 25, 40, 60 y 150 min). A continuación, la enzima fue desactivada por 10 min a 95 °C en calentamiento indirecto en un baño de maría. Se realizó un análisis cuantitativo de la distribución de pesos moleculares de estas muestras, mediante cromatografía líquida de exclusión por tamaño (HPLC-SE). Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución (Agilent 1200, Agilent Technologies Inc., California, EE. UU.), equipado con un detector UV de matriz de diodos operando a 214 nm y a temperatura ambiente. Todas las muestras se filtraron a través de Filtros de PVDF (Millipore) de 0,45 µm antes de la inyección (20 mL) en una columna Yarra SEC-2000 (300 x 7,8 mm). Se empleó como fase móvil Agua y Acetonitrilo en proporción 90/10 (v/v) con 0,03% de TFA (v/v), las muestras fueron eluidas con un flujo constante de 1 mL/min.

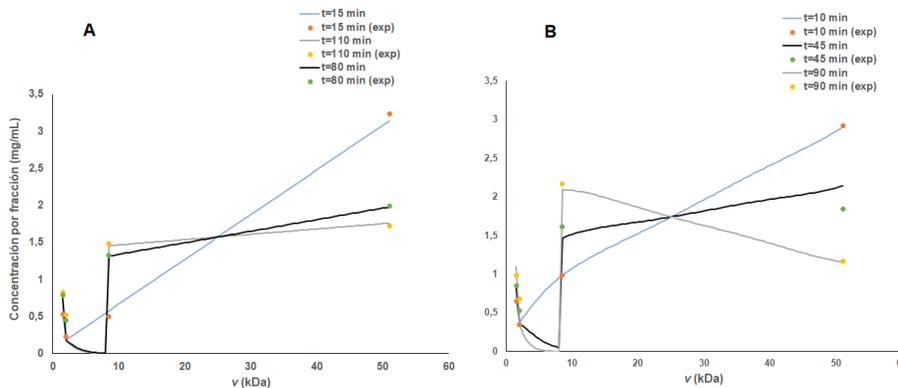


Fig. 6.2. Concentración predicha (línea continua) Vs concentración experimental (puntos) para los hidrolizados enzimáticos de BSA-tripsina determinados por HP-SEC, en distribución de pesos moleculares (v) expresada en kDa, para temperaturas de 35 °C (A) y 45 °C (B).

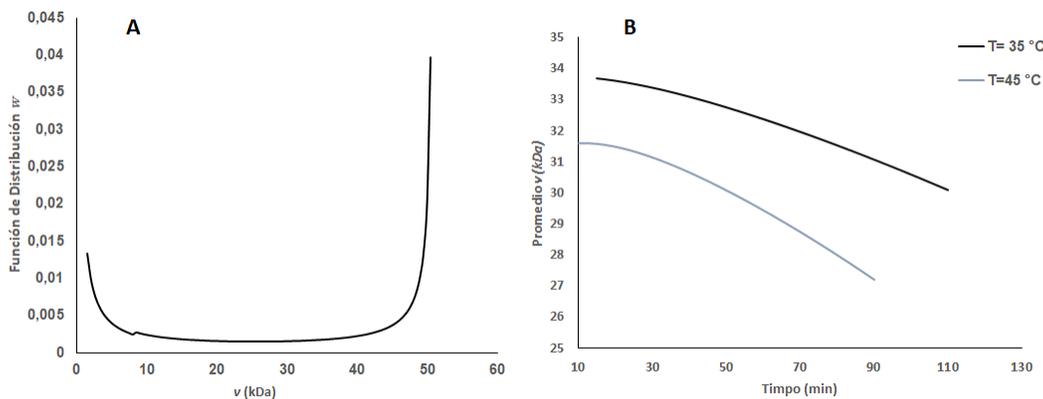


Fig. 6.3 Función de distribución de fragmentos (A) y distribución de pesos moleculares promedios en todo el tiempo de operación para cada experimento a las distintas temperaturas 35 y 45 °C.

La columna se calibró previamente, empleando proteínas de diferentes tamaños como estándar:

Ribonucleasa A (13,7 kDa), Albúmina (44,3 kDa), IgG (150 kDa) y tri-glicina (0,225 kDa), así como un marcador de bajo peso molecular, Glicina (0,075 kDa). La curva de calibración resultante mostró un coeficiente de determinación (R^2) de 0.98. Para analizar la distribución de pesos moleculares de los hidrolizados en el tiempo de reacción, se dividió el cronograma en 4 regiones características de tamaños de acuerdo con el tiempo de elución y la curva de calibración (ecuación 6.23).

$$R_t = -0,818 \cdot \ln(\text{PM}) + 9,337 \quad (6.23)$$

Donde R_t es el tiempo de retención en (min) y PM el peso molecular en kDa.

Los resultados expresados en mg/mL para cada fracción con su respectivo valor promedio de tamaño se muestran en la tabla 6.1.

En la Fig. 6.4, grafica el perfil descrito por el MBP en la línea continua, señalada con diferentes colores, como se ve en la leyenda, para cada tiempo. Las líneas punteadas en colores, corresponden a los datos experimentales. En la parte superior derecha de arriba hacia abajo, se identifican en orden los 5 tiempos experimentales muestreados en la tabla 6.1.

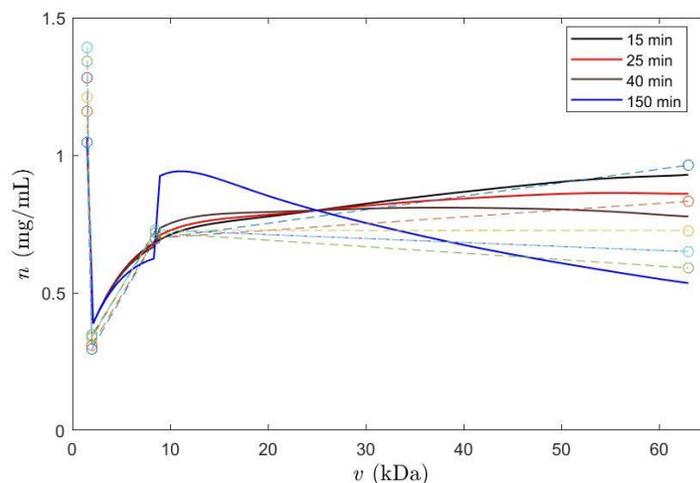


Fig. 6.4. Distribución de pesos moleculares predichos por MBP (líneas continuas en colores) Vs datos experimentales para diferentes tiempos ($t=15,25,40$ y 150 min) de hidrolizados enzimáticos de BSA-Alcalasa determinados por HPLC-SE.

El comportamiento de los pesos moleculares para la hidrólisis en los dos casos (BSA con tripsina y Alcalasa) es típico de un proceso de hidrólisis de proteínas. Rápidamente, por acción aleatoria de la enzima, las fracciones de mayor tamaño se rompen, dando paso a la aparición de porciones peptídicas de menor tamaño.

Tabla 6.1. Resultado de análisis de distribución de pesos moleculares de hidrolizados de BSA con Alcalasa. Determinados por HPLC-SE. Condición de operación única: $T=60$ °C, $\text{pH}=9.0$ y $E:S=1:50$ para 150 minutos de hidrólisis.

Intervalo de tamaño (kDa)	Tiempo (min)	15	25	40	60	150	Tamaño Promedio (kDa)
0-3	Concentración (mg/mL)	1,0472	1,1598	1,2114	1,2814	1,3920	1,5
3-7		0,2953	0,3088	0,3349	0,3406	0,3406	2
7-24		0,6962	0,6987	0,7280	0,7284	0,7284	8,5
24-150		0,9639	0,8325	0,7256	0,6497	0,6497	63

Tripsina y Alcalasa son endo-proteasas y su dinámica de escisión no discrimina la ubicación del enlace a escindir en la cadena proteica. Por otro lado, la BSA es una proteína globular, como se mencionó en el capítulo 4, tiene 17 puentes disulfuro, que condicionan una estructura agregada en un rango de pH amplio. Las dos enzimas, se diferencian en su especificidad. La tripsina, por ejemplo, escinde preferiblemente péptido en las posiciones del carboxilo terminal donde hay Arginina (Arg) o Lisina (Lys). Mientras que Alcalasa, tiene una amplia especificidad y afinidad por una gran variedad de enlaces. Esto puede ser la razón de las diferencias expuestas en la función de frecuencia de ruptura, visible de forma gráfica. Una mayor frecuencia de aparición temprana de fracciones de pequeño tamaño molecular se presenta en la hidrólisis de BSA con Alcalasa, en comparación con los hidrolizados de tripsina a las dos temperaturas analizadas. La tripsina tiende a realizar un fraccionamiento más escalonado, pasando por fracciones intermedias rápidamente y luego aumentando la producción de fracciones más pequeñas. La constante de la función de frecuencia de ruptura para el intervalo de mayor tamaño tiene el orden de 10^{-2} mientras que, en las de menor tamaño, es de 10^{-4} , para los dos casos (tripsina y alcalasa). En el caso de la tripsina, estas constantes aumentan con la temperatura en una relación de 1.5. En la Fig. 6.3 se grafica el promedio de pesos moleculares en el tiempo para la hidrólisis de BSA con tripsina a las dos temperaturas. Estos datos son consistentes con una mayor frecuencia de ruptura a mayor temperatura, se puede notar una disminución más prolongada de pesos moleculares altos a bajos, a medida que avanza el tiempo, para la temperatura más alta.

Se ha documentado también en el capítulo 5, que la hidrólisis de proteínas se ve inhibida por porciones peptídicas que se generan en la reacción. Se comprobó, además, que este efecto inhibitor es más fuerte debido a péptidos de tamaño intermedio, lo cual genera una disminución típica de la velocidad al final de la hidrólisis. En los modelos de población, este efecto está incluido en la función de frecuencia de ruptura.

6.5. CONCLUSIONES

En esta primera aproximación al desarrollo de modelos de balances de población aplicado a reacción de hidrólisis enzimática de proteínas, se pudo identificar los elementos claves implícitos en el fenómeno de ruptura a la luz de mecanismos de distribución de una variable de gran importancia para el estudio de los procesos de hidrólisis como le es el tamaño molecular. El modelo establecido predice en forma apropiada los datos experimentales para sistemas típicos de enzimólisis de proteína y puede ser empleado para comprensión de los procesos de escisión proteica. Pueden ser potencialmente aplicados como herramienta en el estudio de péptidos bioactivos.

REFERENCIAS

- Barros, R. M., & Xavier Malcata, F. (2004). A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 88(3), 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.046>
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2020). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139–150. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
- Butré, C. I., Wierenga, P. A., & Gruppen, H. (2012). Effects of ionic strength on the enzymatic hydrolysis of diluted and concentrated whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(22), 5644–5651. <https://doi.org/10.1021/jf301409n>
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 86, 39–48. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2018.06.018>
- Falola, A., Borissova, A., & Wang, X. Z. (2013). Extended method of moment for general population balance models including size dependent growth rate, aggregation and breakage kernels. *Computers & Chemical Engineering*, 56, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2013.04.017>
- Fernández, A., & Riera, F. (2013). β -Lactoglobulin tryptic digestion: A model approach for peptide release. *Biochemical Engineering Journal*, 70, 88–96. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2012.10.001>
- Ho, Y. K., Kirse, C., Briesen, H., Singh, M., Chan, C.-H., & Kow, K.-W. (2018). Towards improved predictions for the enzymatic chain-end scission of natural polymers by population balances: The need for a non-classical rate kernel. *Chemical Engineering Science*, 176, 329–342. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.10.027>
- Hosseini, S. A., & Shah, N. (2011a). Enzymatic hydrolysis of cellulose part II: Population balance modelling of hydrolysis by exoglucanase and universal kinetic model. *Biomass and Bioenergy*, 35(9), 3830–3840. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.029>
- Hosseini, S. A., & Shah, N. (2011b). Modelling enzymatic hydrolysis of cellulose part I: Population balance modelling of hydrolysis by endoglucanase. *Biomass and Bioenergy*, 35(9), 3841–3848. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.026>
- Inguva, P. K., Schickel, K. C., & Braatz, R. D. (2022). Efficient numerical schemes for population balance models. *Computers & Chemical Engineering*, 162, 107808. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2022.107808>
- Kostoglou, M. (2000). Mathematical analysis of polymer degradation with chain-end scission. *Chemical Engineering Science*, 55(13), 2507–2513. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(99\)00471-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-2509(99)00471-6)
- Marchisio, D. L., Vigil, R. D., & Fox, R. O. (2003). Quadrature method of moments for aggregation–breakage processes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 258(2), 322–334. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(02\)00054-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9797(02)00054-1)
- Marquez Moreno, M. C., & Fernandez Cuadrado, V. (1993). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Process Biochemistry*, 28(7), 481–490. [https://doi.org/10.1016/0032-9592\(93\)85032-B](https://doi.org/10.1016/0032-9592(93)85032-B)
- McCoy, B. J., & Wang, M. (1994). Continuous-mixture fragmentation kinetics: particle size reduction and molecular cracking. *Chemical Engineering Science*, 49(22), 3773–3785.

- [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2509\(94\)00172-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)00172-3)
- Muñoz-Tamayo, R., de Groot, J., Wierenga, P. A., Gruppen, H., Zwietering, M. H., & Sijtsma, L. (2012). Modeling peptide formation during the hydrolysis of β -casein by {Lactococcus} lactis. *Process Biochemistry*, 47(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.10.012>
- PINAR, Z., DUTTA, A., BÉNY, G., & ÖZİŞ, T. (2015). Analytical solution of population balance equation involving aggregation and breakage in terms of auxiliary equation method. *Pramana*, 84(1), 9–21. <https://doi.org/10.1007/s12043-014-0838-y>
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Ramkrishna, D. (2000). *Population Balances: Theory and Applications to Particulate Systems in Engineering*. Elsevier.
- Ramkrishna, D., & Mahoney, A. W. (2002). Population balance modeling. Promise for the future. *Chemical Engineering Science*, 57(4), 595–606. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(01\)00386-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0009-2509(01)00386-4)
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyx006>
- Shi, D., He, Z., & Qi, W. (2005a). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, 40(5), 1943–1949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>
- Shi, D., He, Z., & Qi, W. (2005b). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, 40(5), 1943–1949. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>
- Trusek-Holownia, A. (2008). Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 39(2), 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.010>
- Trusek-Holownia, Anna, & Noworyta, A. (2015). A model of kinetics of the enzymatic hydrolysis of biopolymers – a concept for determination of hydrolysate composition. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 89, 54–61. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2015.01.008>
- Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., & Almonacid, S. (2015). Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 50(4), 589–597. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028>
- Zhao, G., Liu, Y., Zhao, M., Ren, J., & Yang, B. (2011). Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Food Chemistry*, 127(4), 1438–1443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.046>

CAPÍTULO 7. ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE FRACCIONES PEPTÍDICAS DE INTERÉS ANTIOXIDANTE EN PLASMA BOVINO Y DERIVADOS

RESUMEN

En este aparte de han propuesto dos estrategias para la producción de fracciones antioxidantes utilizando proteínas derivadas de plasma bovino. El primer enfoque incluye un análisis del impacto del costo de la enzima en la recuperación de fracciones antioxidantes de hidrolizados de plasma bovino con Alcalasa, como uno de los aspectos claves en el desarrollo de una estrategia de producción industrial. Mientras que un segundo enfoque se centra en comprender posibles aspectos limitantes del uso de BSA bovina como precursora de péptidos antioxidantes y proponer la utilización de tratamientos físicos (Térmicos y ultrasonidos) para la modificación de su estructura y mejora en la recuperación de unidades peptídicas de interés. La condición óptima para obtener fracciones peptídicas con mayor actividad antioxidante con el mejor rendimiento posible fue de: temperatura de 57 °C, pH de 8,5 y E/S de 9,8%. Sin embargo, las más bajas relaciones capacidad antioxidante-costo de enzima, se tienen con adición de enzima en los niveles superiores (entre 9 y 10 %). En cuanto a la hidrólisis de BSA, la actividad antioxidante de las fracciones hidrolizadas ultrafiltradas menores a 3 kDa, tienen una actividad mucho mayor para los tratamientos BSA_T y BSAT+U en comparación que las fracciones obtenidas de proteína nativa o solo tratada con ultrasonido. Tres secuencias peptídicas identificadas que son comunes en estas fracciones destacadas por su mayor actividad *in vitro*, presentan valores importantes de probabilidad asociada con la actividad antioxidante (potencial antioxidante *in silico*).

Palabras clave: Modelamiento matemático; modelos de población; métodos de los momentos

7.1. INTRODUCCIÓN

Estrategia 1.

La búsqueda de hidrolizados con propiedades deseables a partir de proteínas hace necesario el desarrollo de estudios orientados a encontrar la enzima proteolítica adecuada para cada sustrato. Alcalasa 2,4 L ha sido empleada con mucho éxito en numerosas aplicaciones para la obtención de péptidos antioxidantes (Tacias-Pascacio et al., 2020). Se ha demostrado que el éxito en la recuperación de péptidos antioxidantes se debe a la probabilidad de escisión de la proteasa en un sitio clave de la cadena que permita la liberación del péptido activo. Es decir, las propiedades de los hidrolizados obtenidos están relacionadas con la composición peptídica de los mismos. Esto depende a su vez de la especificidad de la proteasa, la cual, condiciona el avance de la reacción y el mecanismo de proteólisis. Este mecanismo sufre modificaciones cuando las condiciones de operación cambian. Por ejemplo, leves alteraciones en la estructura de una proteasa generan fuertes efectos a la función enzimática, por lo cual, factores relacionados con las condiciones de operación (T, pH, Tiempo, agitación, presencia de sales, entre otros aspectos) (Tavano, 2013) siguen siendo aspectos de orden prioritario para mejorar la eficiencia en el uso de proteasas.

Teniendo en cuenta que la mayoría de los problemas en biotecnología son problemas multidimensionales de búsqueda con una gran cantidad de óptimos locales. Una estrategia común para el estudio de las condiciones de trabajo de las reacciones de hidrólisis es desarrollar modelamiento empírico con base en la estadística. Estos modelos suelen ser de gran valor para el análisis de los sistemas complejos. La metodología de superficie de respuesta (RSM) se utilizó con éxito en el estudio de propiedades antioxidantes derivadas de plasma bovino (Figuerola et al., 2016) y en la actualidad, se ha usado en la hidrólisis de procesos enzimáticos con diferentes sustratos y proteasas (Song et al., 2020; Yang et al., 2020). Estos sistemas suelen ser complejos, debido a los variados efectos no lineales que se pueden presentar.

Este estudio propone un enfoque de análisis que incluye el impacto del costo de la enzima en la recuperación de fracciones antioxidantes de hidrolizados de plasma bovino con Alcalasa, como uno de los aspectos claves en el desarrollo de una estrategia de producción industrial. Los costos asociados a la enzima, que están relacionados implícitamente en la cantidad de enzima agregada, deben ser analizados sobre la base de una variable que indique en forma directa el potencial antioxidante, más allá de los efectos de las variables mencionadas (T, pH) sobre el rendimiento de la reacción.

Estrategia 2.

Alcalasa es una enzima de uso extendido en la obtención de péptidos bioactivos (Tacias-Pascacio et al., 2020). Tiene gran especificidad para residuos aromáticos (Phe, Trp y Tyr), ácidos (Glu), con contenido de azufre (Met), alifáticos (Leu y Ala), hidroxilo (Ser) y básicos (Lys) (Doucet et al., 2003). Sin embargo, como todas las enzimas, presenta algunas restricciones. La BSA, por su parte, es una proteína globular compuesta por tres dominios homólogos (I, II, III), unidos mediante puentes disulfuros, protegidos de acción externa a pH neutro, pero más accesibles a valores de pH muy ácidos y alcalinos (Chi et al., 2018). La estructura es predominantemente alfa-helicoidal

(67%)(Murayama & Tomida, 2004). Arrutia et al., (2016) han demostrado que el tratamiento térmico previo a la hidrólisis con tripsina de BSA permite una mejora sustancial, tanto en el GH_{max} (del 30% al 50%), como en el número y concentración de péptidos en relación con la hidrólisis de BSA en estado nativo. Se ha comprobado también, que elevadas presiones hidrostáticas locales generadas por la cavitación acústica tras el tratamiento del sustrato y/o la enzima con ultrasonido mejora la eficiencia de ataque efectivo de las enzimas en las reacciones de hidrólisis (Umego et al., 2021).

A diferencia de otras proteínas contenidas en sangre bovina, no existen en la literatura científica muchos trabajos que aborden la bioactividad de péptidos derivados de hidrólisis enzimática de BSA. Algunos péptidos con potencial bioactivo fueron identificados tras hidrólisis con pepsina (Arrutia et al., 2017), justo en rangos de pHs en los cuales su estructura proteica es ampliamente accesible (Chi et al., 2018) y virtualmente susceptible a los “ataques” enzimáticos. Alcalasa por su parte se ha reconocido por ser una de las enzimas más eficientes en la liberación de péptidos bioactivos de diferentes fuentes de proteínas (Tacias-Pascacio et al., 2020).

En una segunda propuesta estratégica para la producción eficiente de fracciones y péptidos de interés antioxidante se ha planteado hidrolizar BSA bovina con Alcalasa, teniendo en cuenta que se trata de una proteína bastante estudiada, de la cual, no se ha encontrado en la literatura reciente una aplicación que aproveche esta proteína para producción de péptidos antioxidantes con esta enzima. La estrategia inicia con comprender posibles aspectos limitantes del uso de BSA como precursora de péptidos antioxidantes y proponer la utilización de tratamientos físicos (Térmicos y ultrasonidos) para la modificación de su estructura y mejorar en la recuperación de unidades peptídicas de interés.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1 Experimento con plasma bovino entero

7.2.1.1 Sistema de Reacción

Se empleó un reactor de vidrio de 1 L con camisa de circulación de agua para regulación de la temperatura, conectado a un regulador termostático. El control de pH y registro de temperatura, se hicieron con un electrodo combinado de vidrio LL con diafragma esmerilado fijo (temperatura entre 0-80 °C), conectado a un titulador automático Titrande 842 (Metrohm, Suiza), operado por ordenador (software Tiamo 1.2.1). El medio de reacción fue constantemente agitado utilizando un agitador magnético 801 (Metrohm, Suiza)) con velocidad la agitación de 200 rpm.

7.2.1.2 Materiales

Todos los reactivos usados fueron de grado analítico. El plasma fue comprado a un proveedor comercial, en Medellín-Colombia. Presentaba forma líquida, con 70 g/L de proteína. A este, se le realizaron controles microbiológicos de mohos y levaduras, coliformes totales y mesófilos, al momento de la recepción. La enzima usada fue Alcalase 2,4 L grado alimenticio (Novozymes, Dinamarca), la cual es una enzima proteolítica producida por fermentación sumergida de una cepa

seleccionada de *Bacillus licheniformis*. El componente principal es Subtilisina A (Subtilisina Carlsberg).

7.2.1.3 Análisis del contenido proteico

La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford, (Bradford, 1976). La curva patrón se construyó empleando Albumina Bovina referencia A7030 de SIGMA- ALDRICH. La absorbancia se midió a temperatura de 20 °C, longitud de onda de 595 nm, empleando un espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec de SHIMADZU.

7.2.1.4 Actividad enzimática

Para la determinación de la actividad enzimática del complejo comercial Alcalase se utilizó el método modificado de Takami et al. (1989). De acuerdo con este procedimiento una alícuota de 0,25 mL de enzima se incubó con 2,5 mL de solución de caseína 0,6 %, en tampón glicina:NaCl:NaOH (50 mM, pH 8,7 y temperatura de 60 °C). La reacción se detiene por adición de 2,5 ml de solución de TCA (0,11 M ácido Tricloroacético, 0,22M acetato de sodio, 0,33 M ácido acético), la mezcla es centrifugada por 15 min, el sobrenadante se mezcla con 2,5 mL de Na₂CO₃ 0,5 M y reactivo de Folinciocalteu, por 30 min. La densidad óptica se midió a 660 nm empleando un espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec de SHIMADZU. Para la determinación se empleó una curva estándar de solución de Tirosina entre 0-1000 mg/L. En este método una unidad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima que produce un μg de tirosina en 1 min (Takami et al. 1989).

7.2.1.5 Control de la reacción de hidrólisis proteica

Estudios previos de hidrólisis de hemoglobina bovina (Márquez y Vázquez, 1999) y sangre porcina (Pérez-Gálvez R et al., 2011) con Alcalase 2,4L, revelan que concentraciones iniciales de sustratos del orden de 1-10 g/L de proteína presentan buen comportamiento respecto a la velocidad de formación de péptidos. En este caso, se empleó plasma entero bovino con 6 g/L de proteína. Durante la reacción se ajustó el pH (Adicionando NaOH 1N), la relación enzima-sustrato (E/S) y la temperatura en la solución proteica se ajustaron según lo indica el diseño de experimentos (tabla 7.1). La reacción se extendió por dos horas.

La reacción a pH alcalino se monitoreó para la determinación del grado de hidrólisis (GH), Utilizando método de valoración del protón o método del pH-estático en las condiciones expuestas en los capítulos iniciales.

7.2.1.6 Diseño de experimentos y optimización

Se planteó un diseño de experimentos Central Compuesto rotatable (CCR), con tres factores (Temperatura, pH y la relación E/S) y cinco niveles, según se indica en la tabla 7.1. La variable respuesta fue el GH_{max} y la capacidad para captar radicales ABTS (expresada en ET/g proteína). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y el ajuste del modelo en la forma de la ecuación (7.1) utilizando el software *Statgraphics Centurion XVI*. El ajuste del modelo empírico se verificó por

medio del coeficiente de determinación R^2 , según las ecuaciones (7.2). La significancia de los coeficientes estimados en el modelo se probó con el estadístico F y un nivel de confianza de 95 % (Valor – P < 0,05).

Tabla 7.1. Variables y niveles empleadas en el diseño CCR.

Símbolo		Niveles Codificados					
Factores	Codificado	Sin Codificar	-1,68	-1	0	1	1,68
T (°C)	X1	x1	50	55	62,5	70	75
pH	X2	x2	7,4	7,7	8,2	8,7	9
E/S (w/w)	X3	x3	5	6	7,5	9	10

$$Y_j = \alpha_0 \sum_{i=1}^3 \alpha_i X_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^{j=3} \alpha_{ij} X_{ij} \quad (7.1)$$

Donde Y_j es la respuesta predicha (GH), X_i y X_j desde $i, j = 1$ hasta 3 son las variables independientes o factores; α_0 , α_i , α_{ii} , α_{ij} , son los términos independientes, lineales, cuadráticos y de interacción del polinomio.

$$R^2 = \frac{SC_{total} - SC_{error}}{SC_{total}} \times 100 \quad (7.2)$$

Mediante un diseño cuidadoso de experimentos se buscó optimizar por separado y en forma conjunta el GH_{max} y la capacidad antioxidante <<ABTS>>. Se utilizó para este fin una rutina de optimización por metodología de superficie de respuesta, la cual se basa en el método de la máxima pendiente en ascenso. Esta consiste en recorrer la trayectoria de máxima pendiente que conduce a la dirección del máximo aumento en la respuesta. En el caso de la optimización conjunta se empleó el método de la función de deseabilidad, la cual, consiste en definir una función en el espacio de factores que mide la deseabilidad global (DG) del producto predicha en cada punto. Esto convierte el problema en uno de optimización univariado. En el análisis se empleó el software Statgraphics Centurion. Además, los valores óptimos de los factores codificados (T, pH y E/S), se emplearon en la ejecución de tres replicas experimentales, cuyos resultados se compararon con los predichos por el modelo polinomial ajustado y la rutina de optimización.

7.2.2 Experimento con BSA bovina

7.2.2.1 Ensayos de Hidrólisis enzimática de BSA bovina

La hidrólisis *in vitro* se llevó a cabo en un reactor de 100 mL conectados a un sistema de ajuste automático de pH (pH-Buret 24 2s, Crison, España). Como sustrato se empleó Seroalbúmina bovina (BSA $\geq 96\%$, Sigma-Aldrich), la cual fue diluida en agua destilada hasta una concentración

fija de 5 mg/mL. La temperatura y el pH se mantuvieron constantes en los valores definidos previamente de $60 \pm 1^\circ\text{C}$ y 9, respectivamente. Para la hidrólisis se utilizó Alcalase 2.9 L (2,4 AU-A/g) grado alimentario (EC: 3.4.21.14, CALBIOCHEM, Canadá). En todos los experimentos se utilizó la misma relación enzima sustrato E/S= 1:50. El monitoreo de la reacción se hizo utilizando el método del pH-stat descrito en el capítulo 4. La reacción se detuvo inactivando la enzima en un baño de calentamiento a 90°C por 5 min y la actividad enzimática se midió al final usando el método de la sección 7.2.1.4.

Para el análisis del impacto de los tratamientos físicos sobre el sustrato se definió un diseño completamente aleatorizado. Tres tratamientos experimentales se definieron para evaluar el efecto sobre la forma de curva, el GH_{max} y la capacidad antioxidante de los péptidos resultantes, comparados con los obtenidos en condiciones no tratadas (estado nativo de la proteína). Las condiciones se muestran en la tabla 7.2.

Las muestras con tratamiento térmico, fueron sometidas a calentamiento indirecto utilizando baño de maría y agitación continua ($T=80^\circ\text{C}$ -30 min). Para el tratamiento de las muestras con Ultrasonido, se utilizó un Siystem Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Berlín, Alemania), equipado con una sonda MS 73, a una frecuencia de 20 kHz y manteniendo la amplitud de sonicación al 20% (100% de amplitud equivalente a 212 m). Esta amplitud de sonicación se seleccionó después de varias pruebas realizadas previamente. También, se efectuaron algunas mediciones calorimétricas para evaluar la potencia de ultrasonido real (P_{real}), con la ecuación (7.3) (Marcet et al., 2018).

$$P_{\text{real}} = mC_p \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad (7.3)$$

Donde $\langle\langle C_p \rangle\rangle$ se refiere a la capacidad calorífica del solvente usado, $\langle\langle m \rangle\rangle$ es la masa total y dT/dt es el aumento de temperatura por segundo. Luego se determinó la intensidad ultrasónica (UI) usando la P_{real} calculada previamente (7.4).

$$UI = \frac{P_{\text{real}}}{\pi r^2} \quad (7.4)$$

Donde la IU (W/cm^2) se calculó tomando en consideración el radio de la punta de la sonda (r). Las condiciones fijas de los experimentos se establecieron con ensayos previos teniendo como criterio, el aumento significativo de la velocidad inicial de hidrólisis y evitando procesos de agregación.

Tabla 7.2. Condiciones experimentales para el análisis del efecto del tratamiento físico previo al sustrato sobre la tasa de hidrólisis y la actividad antioxidante de las fracciones.

Tratamientos	Condiciones de operación	Respuesta
BSA_Nativa	Sustrato no tratado previamente (nativo)	GH_{max} /ABTS (Ultrafiltrados <3kDa)
BSA_T	Calentamiento en Baño de maría con agitación (80°C - 30 min)	
BSA_U	Sonicado sonda inmersión $t=12,5$ min Amplitud=20 función on-off	
BSA_T+ U	Calentado (80°C - 30 min) y sonicado ($t=12,5$ min Amplitud=20 función On-Off)	

7.2.2.2 Identificación de péptidos UHPLC y Q-TOF-MS

Terminada la reacción, se recogió todo el hidrolizado resultante de cada tratamiento y se sometió a ultrafiltración utilizando tubos de centrifuga Macrosep Advance (tamaño de corte <3 kDa de 25 mL). Se centrifugaron a 5000 x g durante 20 min. La operación se repitió con el sobrenadante para recuperar la mayor cantidad de productos de los tamaños deseados. El proceso de identificación de los péptidos en estas fracciones, se hizo por cromatografía líquida de alta presión con acople a espectrometría de masas en tándem (RP-UPLC-MS/MS) con un Dionex Ultimate 3000 RS UHPLC (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.2.3 (capítulo 4).

Los péptidos identificados en cada fracción experimental, se analizaron con una herramienta de proteómica virtual con el fin de estimar la probabilidad asociada con su capacidad antioxidante. Para esto último, las secuencias se probaron con el meta predictor mAHTPred (<http://thegleelab.org/mAHTPred>), el cual, utiliza, algoritmos de aprendizaje automático, incluida la máquina de vectores de soporte en el desarrollo de modelo de predicción de péptidos antioxidantes, basado en la secuencia del péptido (Manavalan et al., 2018).

7.2.2.3 Mecanismo de reacción y modelo de cinética de reacción

En su análisis teórico sobre el proceso de reacción de hidrólisis enzimática de proteínas, Márquez & Vázquez, (1999) y Qi & He, (2006) proponen una estrategia basada en la suposición de una reacción de orden cero para la formación de productos (7.5) y una de segundo orden para la desactivación enzimática (7.6). Esta estrategia de modelamiento ha sido ampliamente utilizada y recientemente se empleó para modelar la reacción de hidrólisis de BSA con α -quimotripsina y tripsina con tratamientos de alta presión (Maresca & Ferrari, 2017).



Donde E, S y P, representan la concentración de enzima, sustrato y producto, respectivamente. ES; es el complejo enzima sustrato, E_a y E_i indican la concentración de enzima activa e inactiva en la reacción, k₂ es la constante cinética de velocidad de formación de productos, k₃ es la constante de desactivación enzimática. El sustrato (S) en este experimento es la concentración de BSA experimental y P la de péptidos de interés para el análisis.

Según la aproximación de Briggs-Haldane (Rami Tzafirri & Edelman, 2007), la constante de M-M K_m es (7.7):

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad (7.7)$$

Luego, por la aproximación del estado estacionario para el complejo [ES], teniendo en cuenta el balance de enzima y sobre la base de que la velocidad de formación de productos depende solo del paso irreversible de (7.5): $r = k_2 \cdot (ES)$. La expresión para el complejo intermedio es:

$$[ES] = \frac{[E][S]}{k_m} \quad (7.8)$$

El balance de enzima en el sistema queda:

$$e = E + ES \quad (7.9)$$

Realizando las sustituciones y suponiendo $[S] = S_0 \cdot h_{tot.}$, que está definida como la concentración de enlaces peptídicos iniciales. La expresión final de velocidad en la forma del modelo exponencial es:

$$r = s_0 h_{tot} \frac{d(GH)}{dt} = a' \text{EXP}[-b'(GH)] \quad (7.10)$$

Donde a' y b' son:

$$a' = \frac{k_2 e_0}{S_0} \quad (7.11)$$

$$b' = \frac{k_3 k_m}{k_2} \quad (7.12)$$

7.2.3 Análisis de actividad antioxidante (Ensayo de eliminación de radical ABTS^{•+})

La capacidad de las fracciones ultrafiltradas para eliminar radicales ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) se según el método descrito por Watchararужи et al., (2008) modificado. Se preparó una solución inicial de ABTS^{•+} compuesta por una solución acuosa de ABTS^{•+} 7,0 mM y persulfato de potasio 2,45 mM. Esta solución se resguardó a temperatura ambiente y sin acceso de luz por 16 h antes de usarse en los análisis. Al momento de medir se diluyó en agua destilada hasta alcanzar una absorbancia de $0,70 \pm 0,06$ a 734 nm en una cubeta de 1 cm. Los hidrolizados provenientes de cada experimento (tanto los de sangre bovina como los de BSA) se ajustaron a concentraciones desde (de 0,3-5 mg/mL) y se mezclaron alícuotas de 166 μ L con 4830 μ L de la solución ABTS^{•+} y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min. La absorbancia de las muestras se midió a 734 nm. Se realizó control positivo (Trolox) y negativo (agua). Se calculó el porcentaje de la capacidad de eliminación (SC%) en cada concentración y el IC₅₀. El SC% se calculó utilizando la ecuación (7.13)

$$SC\% = \left[1 - \left(\frac{A_m}{A_c} \right) \right] 100 \quad (7.13)$$

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1 Optimización de condiciones de operación para la producción de antioxidantes de plasma bovino

7.3.1.1 Modelos de regresión y rutina de optimización

En este experimento, Alcalasa 2.4 L fue empleada para hidrolizar plasma entero bovino en las condiciones fijadas de las variables de entrada (Sección 7.2.1.6). En la tabla (7.3) se muestra el diseño de experimentos y los valores de las variables de respuesta (GH_{\max} y $\mu\text{molET/g}$ proteína para la actividad antioxidante medida por ABTS). Estos datos se emplearon para el ajuste de un modelo polinomial de segundo orden de la forma de la ecuación (7.1). Los coeficientes del modelo, se determinaron por análisis de regresión, resultando las ecuaciones (7.14 y 7.15), como modelos característicos del comportamiento de las respuestas evaluadas contra las variables independientes (T, pH y E/S) en los niveles analizados.

Tabla 7.3. Resultados del diseño experimental central compuesto con respuestas evaluadas

Exp	Temperatura (°C)	pH	E/S (% P/V)	GH_{\max} (%)	ABTS ($\mu\text{mol ET/g}$ proteína)
	X1	X2	X3	Y1	Y2
1	55,0	7,7	6,0	13,8	704,0
2	55,0	7,7	9,0	17,6	978,9
3	55,0	8,7	6,0	15,8	864,3
4	55,0	8,7	9,0	19,8	1307,0
5	62,5	8,2	7,5	18,8	1006,1
6	62,5	8,2	5,0	18,0	1196,7
7	62,5	8,2	10,0	20,5	1150,0
8	62,5	9,0	7,5	20,4	1171,9
9	62,5	8,2	7,5	20,6	1010,0
10	62,5	8,2	7,5	19,5	1062,5
11	62,5	8,2	7,5	19,3	1081,9
12	49,9	8,2	7,5	10,2	765,6
13	70,0	7,7	9,0	13,9	777,3
14	70,0	7,7	6,0	12,2	843,1
15	70,0	8,7	9,0	14,8	774,9
16	62,5	7,4	7,5	18,1	906,9
17	70,0	8,7	6,0	13,5	843,1
18	75,1	8,2	7,5	9,3	657,8

$$\begin{aligned} \text{GH}_{\max} = & -391,848 + 8,98795 * T + 25,0944 * pH + 6,13536 * E/S - \\ & 0,0651348 * T^2 - 0,0696333 * T * pH - 0,0551889 * T * E/S - 1,15615 * \\ & pH^2 - 0,0325 * pH * E/S - 0,112851 * E/S^2 \end{aligned} \quad (7.14)$$

$$\text{ABTS} = 25573,8 + 501,28 * T + 2392,72 * \text{pH} + 194,193 * E/S - 2,43207 * T^2 - 16,3587 * T * \text{pH} - 9,46067 * T * E/S - 87,7051 * \text{pH}^2 + 27,57 * \text{pH} * E/S + 13,0598 * E/S^2 \quad (7.15)$$

Los modelos así expresados, tienen un gran poder de predicción, debido a su fuerte correlación, con coeficientes de determinación $R^2 = 0,96$ para el GH_{max} y $R^2 = 0,9$ para $\mu\text{mol ET/proteína}$ (actividad ABTS). En los dos casos, la prueba de hipótesis de falta de ajuste del modelo es satisfactoria, lo cual demuestra que, los mismos representan adecuadamente los datos experimentales (tabla 7.4). La temperatura influencia de manera importante el GH_{max} de la reacción, teniendo en cuenta que, los términos lineales y cuadráticos muestran un efecto significativo elevado con valores $p \leq 0,02$ y $p \leq 0,01$ respectivamente. En la misma forma, los efectos lineales de la E/S, son significativos en la capacidad para predecir un GH_{max} en los niveles evaluados de las variables independientes. Mientras que una influencia marginal se identifica en el pH con $p \leq 0,03$.

Un máximo para el factor: E/S, definida en este trabajo, como el cambio de nivel de enzima para un sustrato constante, se alcanza justo en el mayor nivel experimental evaluado (E/S= 10,0). El aumento de E/S eleva la velocidad de hidrólisis como es común que ocurra cuando las concentraciones de enzimas son relativamente bajas en relación con las concentraciones críticas que inducen saturación en sistemas de reacción de hidrólisis enzimática (tabla 7.4).

Tabla 7.4 Análisis de varianza (ANOVA) para los coeficientes regresión de los modelos ajustados con el diseño de experimentos

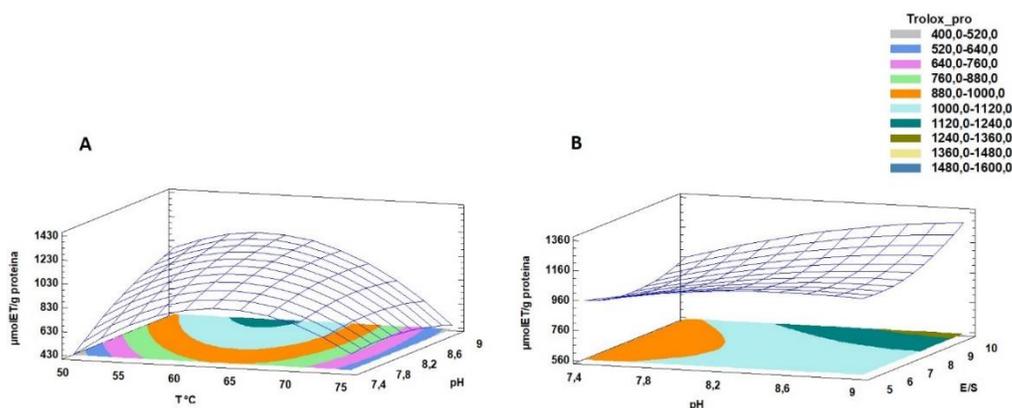
Fuente	GH_{max} (%)		ABTS ($\mu\text{mol ET/proteína}$)	
	Y1	Y2	Y2	Y2
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
T	27,53	0,0135	32,51	0,0107
pH	14,53	0,0317	43,94	0,007
E/S	30,19	0,0119	13,14	0,0361
T^2	312,56	0,0004	161,92	0,001
T*pH	1,02	0,3865	20,96	0,0196
T*E/S	5,78	0,0956	63,09	0,0042
pH^2	1,71	0,2826	3,65	0,1521
$\text{pH} * E/S$	0,01	0,9308	2,38	0,2205
E/S^2	1,5	0,3079	7,47	0,0717
Falta de ajuste	2,94	0,2022	7,95	0,0592

En cuanto a la capacidad antioxidante medida por ABTS, la tabla de ANOVA, indica que, los efectos lineales de todos los factores ($p \leq 0,05$) y el cuadrado de la temperatura junto con sus interacciones con los demás factores ($p \leq 0,05$), son significativos en la definición de un modelo que explica la capacidad de las fracciones hidrolizadas de plasma bovino para captar radicales $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Lo cual significa que, las variables de estudio no solo afectan la respuesta en forma lineal, sino que en su relación intervienen efectos de segundo orden e interacciones complejas, dignas de ser analizadas. Se destaca en este modelo, la marcada influencia del pH ($p \leq 0,007$) y el cuadrado de la temperatura ($p \leq 0,001$) sobre la respuesta evaluada. Como se muestra en la Fig. 7.1A y B, la

tasa de captación de radicales $ABTS^+$ aumenta primero y luego disminuye tras el aumento de la temperatura. Mientras que mayores capacidades se predicen en la región cercana al máximo nivel de los factores pH y E/S. Un comportamiento similar se evidencia en la superficie que representa la variable de respuesta GH_{max} , contra el pH y la E/S. Ahora, la región de máxima respuesta se encuentra sutilmente más cerca del nivel central de T evaluado (Fig. 7.2 A y B). Los resultados sugieren que puede existir ligero conflicto entre las respuestas predichas de GH_{max} y la capacidad antioxidante ABTS.

En un primer paso, una rutina de optimización utilizando la metodología de superficie de respuesta se llevó a cabo con cada modelo (análisis por separado). En un segundo paso, la estrategia se basó en optimización de dos objetivos, empleando la función de deseabilidad como criterio de maximización. Los óptimos estimados con cada uno de los modelos seleccionados se muestran en la tabla 7.5. También, se muestra las condiciones óptimas y la respuesta estimada para la rutina de optimización conjunta de los dos objetivos (GH_{max} y capacidad para captar radicales $ABTS^+$).

En general, un aumento del GH_{max} se relaciona con mejoras sustanciales de la actividad antioxidante medida por distintos métodos (Liu et al., 2010). Esto se debe a que, en relación con la proteína original, con frecuencia los péptidos de menor tamaño, producidos tras la hidrólisis, exponen mejores capacidades para reaccionar-interactuar con los radicales libres (Elias et al., 2008). En el capítulo 3, se evidenció que para una concentración de enzima fija, el GH aumenta con el tiempo y con él mejora la capacidad de los péptidos para captar radicales ABTS. Los resultados actuales, muestran que, en efecto, esto se cumple para una amplia zona de los niveles de las variables analizadas. Pero a juzgar por la leve variabilidad de los resultados de la optimización, en realidad, el conjunto de factores (T, pH y E/S), como es común que ocurra en operaciones de hidrólisis enzimática de proteínas, influyen las propiedades catalíticas de la proteasa y la estructura de las proteínas en solución, propiciando una modulación de la cinética de reacción y el mecanismo de proteólisis y por lo tanto, la composición de péptidos en el sistema (Beaubier et al., 2021; Cheison et al., 2011).



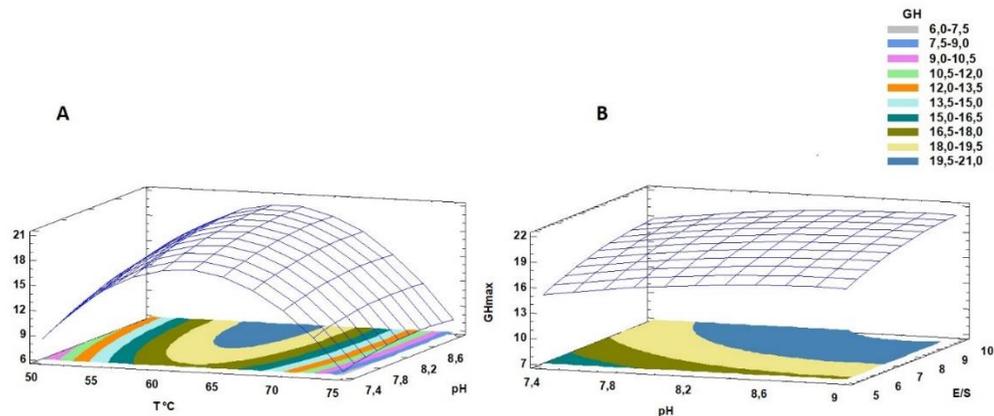


Fig. 7.2. Superficie de respuesta para la optimización GH_{max} de hidrolizados de plasma bovino-Alcalasa 2.4 L; A) Comportamiento de la T °C y el pH para un nivel de E/S= 7,5% (p/p) y B) Comportamiento de la pH y la E/S para un nivel de $T= 62.5$ °C.

Tres ejecuciones experimentales en las condiciones óptimas obtenidas con la rutina de optimización múltiple, se usaron para validar la capacidad del modelo para predecir de manera conjunta el GH_{max} y la actividad ABTS. Los resultados se muestran en la tabla 7.5, con su respectivo error estimado.

Las reacciones que involucran hidrólisis enzimática se analizan, básicamente, con tres criterios de rendimiento. El primero es el nivel de funcionalidad o propiedad objetivo (aplicabilidad del producto obtenido). Mientras que los otros dos son criterios tecno económicos: el costo enzimático y la duración de la reacción (Beaubier et al., 2021). En este caso en particular, estamos enfocados en obtener las condiciones de operación que permitan producir las fracciones peptídicas con mayor capacidad antioxidante, obteniendo un alto rendimiento neto de ruptura. Es importante que, además, el criterio de costo sea considerado. El mayor costo independiente asociado a la producción de péptidos bioactivos de plasma bovino, deriva de la cantidad de enzima empleada.

En aplicaciones industriales comunes de proteólisis enzimática, el tiempo de reacción oscila entre 1 y 5 h debido a las limitaciones técnicas. Algunas de las cuales, pueden estar relacionadas con el riesgo de desarrollo microbiano, si la operación va más allá de este tiempo (Beaubier et al., 2021). El análisis de los datos experimentales, incluidos los experimentos del Capítulo 3, indican que, en efecto, existe una relación directa entre el tiempo de hidrólisis (puesto que aumenta el rendimiento neto de la reacción, expresado en GH_{max}) y la capacidad de los péptidos producidos para captar radicales de ABTS, como expresión de la capacidad antioxidante. Sin embargo, para las cantidades de enzima utilizadas en el límite de los 120 minutos, la pendiente de velocidad Vs tiempo disminuye sustancialmente, como es clásico en reacciones de esta naturaleza. Luego el criterio tiempo ha sido considerado constante al límite de 2 h.

Para analizar el impacto del costo de la enzima en el proceso, se ha tomado como indicador el poder antioxidante total, expresado en este experimento como los $\mu\text{molET/g}$ proteína. El costo de la enzima se relaciona con el nivel E/S empleado en cada unidad experimental del diseño, puesto

que representa la cantidad de enzima por masa de proteína en solución. El costo de la enzima comercial Alcalasa 2.4 L se tomó como 50 €/kg (Dato proporcionado por el proveedor de costumbre en la última cotización. De acuerdo con esta información, el criterio empleado en el análisis del rendimiento en costos de la hidrólisis de plasma bovino con Alcalasa 2.4 L son los $\mu\text{molET}/\text{€}$. Es decir, los equivalentes de Trolox (como una medida de la capacidad antioxidante) por cada Euro asociado al costo de enzima utilizada.

Es lógico esperar que, al aumentar en el nivel de enzima se produzca también, un aumento de la actividad de los péptidos, puesto que, se eleva el rendimiento neto de la reacción y con él, la cantidad de péptidos de menor tamaño molecular, relacionado con la actividad antioxidante (Morales-Medina et al., 2017)(Morales-Medina et al., 2017)(Morales-Medina et al., 2017)(Di Bernardini et al., 2011). Los modelos de las ecuaciones (7.14 y 7.15), se usaron una vez más en una rutina de optimización conjunta, basada en la restricción de E/S en cinco niveles, cubriendo el rango de operación del diseño (6,7,8,9 y 10 % (p/p)). La actividad antioxidante estimada, se emplea para el cálculo de μmolET por unidad de costo de enzima. Esto permite, analizar el papel de la temperatura y el pH sobre el costo por unidad de enzima y el rendimiento en GH_{max} . En la tabla 7.6, se muestran los valores estimados.

Los resultados muestran que, las más bajas relaciones capacidad antioxidante-costo de enzima, se tienen con adición de enzima en los niveles superiores (9 y 10 %). Aunque, estos resultados son bastantes similares a los obtenidos con los niveles intermedios de enzima (7 y 8 %), lo cual coincide con valores de GH_{max} en el rango de 19,2-20 %. En cambio, una relación actividad-costo mucho mayor (un 17% más que el promedio obtenidos con los niveles restantes) se presenta cuando la cantidad mínima analizada de enzima se utiliza en el sistema, justo con GH_{max} cercanos a 19%. Temperaturas relativamente altas, del orden de 62 °C y pH más cercanos a la neutralidad, son necesarios para la economía del proceso de hidrólisis en las regiones de baja concentración de enzima.

Tabla 7.5. Resultados de la optimización individual y la múltiple para el GH_{max} y la actividad ABTS de hidrolizados de plasma bovino-Alcalasa 2.4L.

Condiciones Óptimas (MSR)			
Variables	Óptimos Individuales		Óptimo múltiple
	Y1= 21,6	Y2= 1471,8	Y1=20,7; Y2=1377
T (° C)	60	54	57
pH	8,9	8,8	8,5
E/S (p/V)	10	10	9,8
Óptimo múltiple Experimental	Y1=20,8 ± 0,2; Y2=1322 ± 57		

Tabla 7.6 Análisis de μmolET por unidad de costo de enzima y su relación con las condiciones óptimas de operación (T y pH) para distintos niveles de E/S.

E/S (p/p)	T (° C)	pH	GH _{max}	$\mu\text{mol Trolox/€}$
6	61,68	8,8	18,84	3557,30
7	62,5	8,2	19,22	2970,86
8	57,3	9	19,80	2990,38
9	55,2	9	19,45	2833,07
10	55	10	19,91	2943,56

7.3.2 Impacto del tratamiento térmico y con ultrasonido en el potencial antioxidante y el contenido de péptidos de hidrolizados de BSA bovino con Alcalasa.

BSA es la proteína presente en mayor cantidad en el sistema circulatorio de los mamíferos. Esta proteína tiene una estructura primaria conformada por 583 aminoácidos con 17 enlaces disulfuro y un grupo cisteína libre, y la estructura secundaria está compuesta por 67% hélice, 10% giro y 23% cadena extendida. Representa el porcentaje más alto de las proteínas recuperadas por centrifugación de la sangre en el plasma bovino (Arrutia et al., 2016; Murayama & Tomida, 2004). Por esa razón, se propuso como proteína de prueba para analizar los efectos del tratamiento térmico y de ultrasonido, previo a la hidrólisis enzimática con Alcalasa 2.9 L, para la obtención de péptidos de interés antioxidante.

7.3.2.1 Curva de hidrólisis de BSA con y sin tratamiento previo

En la Fig. 7.3, se puede apreciar la curva GH Vs tiempo, para los tres tratamientos propuestos, comparadas con la curva de BSA sin tratar. En todos los casos, la hidrólisis ocurre a las mismas condiciones de T, pH y E/S. Como se puede ver, el tratamiento térmico y/o con ultrasonido previo, impactan positivamente la velocidad de hidrólisis enzimática de BSA por Alcalasa 2.4L. Puesto que, un mayor tiempo de hidrólisis (7 horas) es necesario para alcanzar GH_{max} promedio de $13,3 \pm 0,2$ en comparación contraste con el que se logra hidrolizando proteínas previamente tratada (alrededor de 2 horas). Se evidencia también, que este comportamiento es una tendencia en el tiempo de hidrólisis total, puesto que, una pendiente menos inclinada se aprecia en la curva de BSA nativa en comparación con las curvas con tratamiento. Esto significa que, para todos los tiempos, es posible obtener GHs más elevados en la hidrólisis de BSA tratada que la nativa. Arrutia et al., (2016), advierten, de la dificultad para hidrolizar BSA en estado nativo con tripsina. Al respecto, argumentan que, el carácter globular de la estructura y la existencia en la cadena de números puentes disulfuros no hidrolizables, dificulta en gran medida el acceso de la enzima a los sitios de escisión (Arrutia et al., 2016; Shi et al., 2005). Se ha comprobado, además, que la desnaturalización previa de las proteínas, propicia una mejora en la eficiencia de las reacciones de hidrólisis.

Cuando la cadena proteica se despliega por efectos del calor, se incrementa el número de sitios de unión expuestos al ataque enzimático, lo que aumenta la probabilidad de escisión de los enlaces peptídicos (Maresca & Ferrari, 2017). Algo similar ocurre con el tratamiento por ultrasonido ya que puede cambiar las estructuras de hélice α y hoja β de la BSA, obteniendo condiciones que favorezcan el ataque enzimático, propiciando así, una mejor y mayor frecuencia unión a los sitios

de escisión (Durão et al., 2006; Zhao et al., 2020).

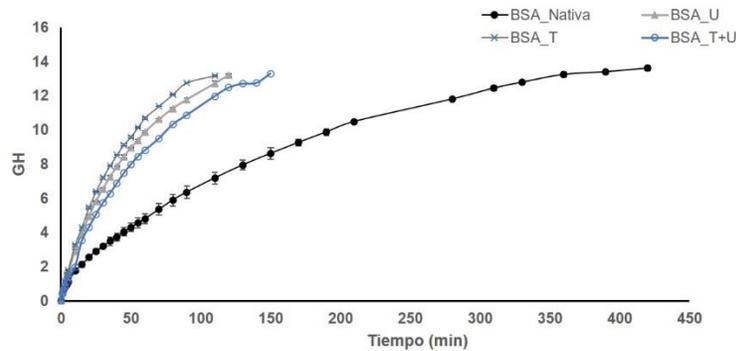


Fig. 7.3. Curva de GH Vs tiempo (min) para hidrolizados de BSA bovina con Alcalasa 2.9 L.

7.3.2.2 Análisis conceptual del modelo cinético

El comportamiento cinético de la reacción de hidrólisis de BSA con Alcalasa 2,4L se puede ajustar al descrito por la ecuación (7.10). Usada con éxito en el análisis de la hidrólisis de BSA con serina-proteinasas: tripsina y quimotripsina (Maresca & Ferrari, 2017; Qi & He, 2006). Los parámetros “a” y “b” se relacionan con el mecanismo cinético de acuerdo con (7.5-7.10).

Tabla 7.7. Estimación de parámetros “a y b” del modelo cinético por ajuste no lineal.

Tratamiento	a (min)	b	a*b	R2
BSA_Nativa	0,133	0,1695	0,02	0,998
BSA_T	0,4431	0,1573	0,07	0,999
BSA_U	0,3891	0,1598	0,06	0,997
BSA_T+U	0,3188	0,1562	0,05	9,992

En la tabla 7.7, se muestran los valores de las constantes del modelo de la ecuación (7.10), estimados con los datos experimentales GH Vs tiempo, para cada condición de operación analizada. El parámetro “b” no presenta variaciones importantes de acuerdo con cada condición de operación. Sin embargo, el calculado con los datos de hidrólisis de BSA nativa, presenta una ligera desviación de la media estimada con las otras curvas. Según el mecanismo, este parámetro se relaciona directamente con el k_m y la constante de desactivación enzimática k_3 e inversamente con la constante de formación de producto. Por otra parte, el parámetro “a” tiene un significado físico explícito, puesto que, se relaciona directamente con la constante de formación de producto k_2 y la relación E/S. De esta manera, “a” se puede utilizar para comprender mejor los efectos de los tratamientos previos a la proteína (térmicos y/o ultrasonidos) sobre el rendimiento de la reacción de hidrólisis. Puesto que, todos los experimentos se realizaron en las mismas relaciones E/S, si el mecanismo se cumple, los cambios en el parámetro “a” sugieren cambios en la constante cinética de velocidad de hidrólisis.

Como es de esperar, cada tratamiento afecta directamente la velocidad con tasas mayores en la hidrólisis de BSA_T. La hidrólisis sin tratamiento previo (BSA_Nativa), presenta por supuesto la menor magnitud en el parámetro “a” asociado con una menor aceleración de la cinética de ruptura por parte de la enzima. Estos cambios en la curva, también se pueden deber a los efectos de la inactivación de la enzima. En el mecanismo, el producto “a*b” es igual a: $k_d * e_0 / s_0$ y puesto que la relación E/S inicial es la misma para todos los tratamientos, este producto se relaciona de forma directa con la constante de inactivación de la enzima. En la tabla 7.7, se aprecia también, el producto “a*b” resultado de cada tratamiento.

Según el mecanismo propuesto, y a juzgar por las pequeñas variaciones en los valores esperados de k_d de acuerdo con cada tratamiento. Los efectos de la desactivación en las diferentes condiciones de operación no parecen ser relevantes. Aunque es claro que, presentan variaciones, tal vez debido a diferencias en los mecanismos de modulación de la actividad por efectos del sustrato, el cual, en la práctica, se expresa como uno de naturaleza distinta en cada caso. En el capítulo 5, se ha demostrado que, la actividad de enzima puede estar modulada por la presencia del sustrato. Al respecto, Valencia et al., (2014) han indicado que, estos efectos son distintos para distintas concentraciones de sustrato.

7.3.2.3 Análisis de la actividad antioxidante de los hidrolizados de BSA.

Culminada la hidrólisis, en cada tratamiento, las fracciones peptídicas de interés antioxidante se recuperaron por Ultrafiltración, empleando tubos de centrifugación Macrosep Advance (tamaño de corte <3 kDa). La actividad antioxidante *in vitro* empleando la técnica de ABTS se determinó a cada muestra. Los resultados se muestran en la tabla 7.8. Los valores de IC_{50} presentan algunas diferencias para cada fracción ultrafiltrada. Los mejores valores se presentan con las muestras sometidas a tratamiento térmico (BSA_T) y tratamiento térmico más ultrasonido (BSA_T+U). Los equivalentes de trolox para estas concentraciones son muy similares (sin diferencia significativa $p < 0,05$). Nuevamente, resaltamos el hecho de que, resultados de capacidad de captación de radicales ABTS⁺ diferentes en magnitud, se han obtenido de hidrolizados enzimáticos con GH_{max} similar. Como se discutió en el capítulo 4 y 5. Cambios en la selectividad de la enzima se propician al variar las condiciones de operación (Deng et al., 2018). Anqué en este experimento, no se han cambiado las condiciones de operación, las características nativas de la proteína hidrolizada fueron modificada a través de los tratamientos físicos.

Tabla 7.8. Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de BSA con y sin tratamiento físico previo.

Concentración mg/mL	0,3	0,6	1,2	2,5	5	IC_{50} (mg/mL)	$\mu\text{molTrolox/g}$
BSA_Nativa	32,8	55,5	68,9	86,7	97	0,55	525,29
BSA_T	44,6	66,4	73,4	94,6	98,1	0,32	1347,53*
BSA_U	40	60	71,6	87,7	99,1	0,43	965,77
BSA_T+U	51,2	56,1	74,8	87,2	99,2	0,33	1337,7*

Estas variaciones en la actividad antioxidante in vitro, deben estar relacionadas con los péptidos presentes en cada fracción.

7.3.2.4 El rol de los péptidos identificados en la actividad antioxidante de los hidrolizados de BSA.

Los resultados del análisis de ABTS, sugieren que, en efecto, existen péptidos con importante potencial antioxidante en las fracciones peptídicas mencionadas. Las hidrolizados obtenidos de la proteína sin pretratar presentaron los índices relativos más bajos de actividad, mientras que técnicamente la reacción es sustancialmente más lenta. Esto significa que, aunque se logren impotentes niveles de actividad, el costo de operación implícito en el tiempo de operación, sugiere sin duda que, puede resultar operacionalmente viable, la estrategia de tratamiento físico previo al sustrato, por lo menos en el caso de BSA y su hidrólisis con Alcalasa.

Para el análisis de la relación entre la actividad y la población de péptidos en cada muestra (fracciones <3 kDa) se ha tomado como referencia los tratamientos con mayor impacto sobre la actividad antioxidante. En su orden son: Tratamiento térmico (BSA_T) y tratamiento térmico más ultrasonido (BSA_T+U). Los péptidos presentes en estas muestras fueron identificados y comparados con los obtenidos en la hidrólisis de BSA sin tratamiento previo. En la figura 7.4, se puede ver la distribución de péptidos presentes en cada fracción indicada, teniendo como criterio el número de residuos de aminoácidos, como una medida indirecta de su masa molecular. Se evidencia una mayor proporción de péptidos con menor número de residuos en las muestras tratadas físicamente. También se puede ver, una mayor presencia de péptidos con un mayor número de residuos de aminoácidos en los hidrolizados de BSA nativa. Se ha informado que los péptidos con pesos moleculares más bajos, tienen un mayor potencial para la eliminación y captación de radicales, en la medida en que son capaces de combinarse eficientemente con la molécula diana (Wen et al., 2020). Este resultado demuestra que, el tratamiento térmico y el ultrasonido puede mejorar la recuperación de péptidos con capacidad para captar radicales de ABTS y que la tecnología de ultrafiltración, es en efecto, una buena alternativa para la concentración de estos compuestos.

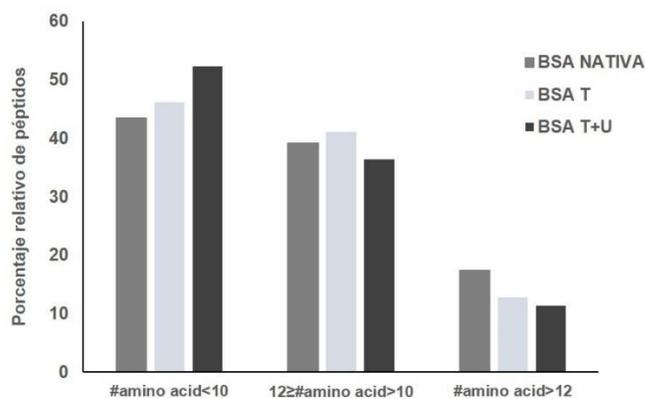


Fig. 7.4. Distribución de péptidos identificados en cada tratamiento y BSA sin tratar de acuerdo con el número de residuos en la secuencia.

Como se ha mencionado, la exposición de la actividad antioxidante de moléculas peptídicas está estrechamente relacionada con otras características fisicoquímicas distintas al tamaño molecular. La secuencia y posición específica de los aminoácidos en la cadena primaria es determinante en esta actividad (Zou et al., 2016). Así, por ejemplo, el carácter hidrófobo de aminoácidos antioxidantes como: la glicina, el ácido glutámico, la alanina y el ácido aspártico permite una mayor exposición de los mismos en estructuras peptídicas de tamaño pequeño, lo que promueve las interacciones entre péptidos y compuestos lipídicos, potenciando por tanto, la capacidad para mejorar la estabilidad de los radicales (Zhu et al., 2022).

Se ha discutido en varios apartes de este trabajo que, la frecuencia de producción de ciertos péptidos en una reacción de hidrólisis enzimática depende sustancialmente de la especificidad de la enzima. Esta preferencia de la enzima por un lugar específico de escisión en la cadena, se relaciona con los aminoácidos vecinos (Schechter & Berger, 1967) y la selectividad (Butré et al., 2014). Es un hecho que ninguna proteasa hidroliza con eficiencia absoluta todos los probables sitios de escisión (Deng et al., 2018). Los tratamientos físicos efectuados alteran la estructura de la proteína (Murayama & Tomida, 2004; Umego et al., 2021), aumentando la probabilidad de que la enzima pueda reaccionar en sitios específicos no escindidos tras la hidrólisis de la proteína en condiciones nativas. Esto significa la generación de péptidos de naturaleza variada y en concentraciones distintas.

La figura 7.5, se muestra un perfil del porcentaje relativo de aminoácidos en la posición P1, de acuerdo con la nomenclatura de Schechter & Berger, (1967), para las diferentes fracciones peptídicas identificadas por espectrometría de masas. Cada barra representa una relación porcentual entre el número de veces en el cual, el respectivo aminoácido aparece en las secuencias identificadas en la posición P1, en relación con la frecuencia del mismo, en la estructura primaria. Así por ejemplo, la Lys (K) es el aminoácido que más aparece formando parte de la posición P1 (15, 24 y 23 veces en las fracciones BSA_Nativa, BSA_T y BSA_T+U respectivamente) en los péptidos identificados y es también la segunda en orden de frecuencia de aparición en la cadena de BSA (60 residuos de Lys en la cadena de BSA), por lo cual, el porcentaje relativo es 25, 40 y 38% respectivamente, en cada fracción.

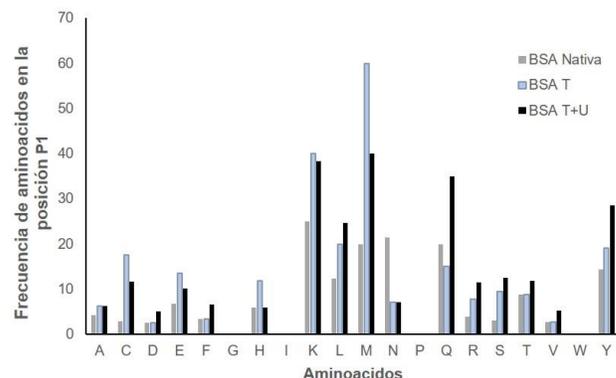


Fig. 7.5. Frecuencia de aminoácidos ocupando la posición P1 (Schechter & Berger) en los péptidos identificados en cada fracción analizada, correspondiente a los tratamientos realizados a la proteína.

Estos resultados permiten apreciar una tendencia general al aumento de la frecuencia de aparición en la posición P1, luego del tratamiento físico, para la mayoría de los aminoácidos con excepción del Asn (N). Esta tendencia es consistente con la aparición de nuevos péptidos que no se producen en la etapa de hidrólisis de la proteína en estado nativo. Esta información coincide con los resultados encontrados por Doucet et al., (2003), en su análisis sobre la especificidad relativa de la Alcalasa, tras caracterización de hidrolizados de proteínas de suero lácteo. En las condiciones de reacción de este trabajo, Alcalasa tiene una fuerte tendencia a hidrolizar BSA, muy cerca de los aminoácidos Leu (L), Lys (K) y Gln (Q).

Un mayor número de péptidos fue identificado en la fracción BSA_T+U, seguido por BSA_T, mientras que los hidrolizados de BSA_Nativa tenían el menor número de secuencias. En la tabla 7.9, se pueden ver las secuencias identificadas con alta probabilidad asociada para exhibir actividad antioxidante según el meta predictor mAHTPred. También se identifica, en frente de cada secuencia, información sobre el peso molecular, su posición en la estructura primaria de BSA bovina y la fracción experimental (BSA_T+U, BSA_Nativa y BSA_T) en la cual se encuentran. Las secuencias, también, se buscaron en la base de datos de BIOPEP-UWM: Bioactive péptidos, pero no se recuperó ninguna.

Tabla 7.9. secuencias peptídicas identificadas con potencia antioxidante estimada por el meta predictor: mAHTPred.

Fracción (s)	Secuencia	Masa Molecular (Da)	m/z	Ubicación en estructura primaria**	Probabilidad Asociada*
BSA_Nativa/BSA_T /BSA_T+U	E.KDAIPENLPPLTA.D	1377,8	689,9	f(318-330)	0.7245
	E.KDAIPENLPPLTAD.F	1492,8	747,4	f(318-331)	0.6690
	R.KVPQVSTPTL.V	1068,6	535,3	f(437-446)	0.8830
	L.TPDETYVPK.A	1048,5	525,3	f(515-523)	0.8197
	T.RKVPQVSTPTL.V	1224,7	613,4	f(436-446)	0.8914
	T.PDETYVPK.A	947,5	474,7	f(516-523)	0.8394
BSA_T /BSA_T+U	Y.TRKVPQVSTPTL.V	1325,8	663,9	f(435-446)	0.6539
	S.ALTPDETYVPK.A	1214,6	608,3	f(513-523)	0.7846
	E.KDAIPENLPPLTA.D	1377,8	689,9	f(318-330)	0.9655
BSA_T	K.LKPDPNTL.C	896,5	449,3	f(139-146)	0.8014
	Y.EIARRHPYFY.A	1350,7	451,2	f(164-173)	0.4536
BSA_T+U	K.VPQVSTPTLVE.V	1168,6	585,3	f(438-448)	0.7230
	Y.FYAPPELL.Y	851,4	852,5	f(172-178)	0.7031
	A.LTPDETYVPK.A*	1161,6	581,8	f(514-523)	0.8570
	Q.NALIVRY.T	847,5	424,8	f(428-434)	0.6117
	K.TPVSEKVTK.C	987,6	494,8	f(490-498)	0.4780

Tres secuencias comunes en las fracciones hidrolizadas, físicamente pretratadas (BSA_T /BSA_T+U), presentan valores importantes de probabilidad asociada con la actividad antioxidante (ver tabla 7.9). Estos péptidos son ricos en Pro (P) y los residuos se ubican en posiciones cercanas al C-terminal del péptido. Ninguno de los péptidos identificados tiene Pro en la posición P1, debido tal vez a la poca especificidad de Alcalasa para escindir en estas posiciones. Las secuencias: <<E.KDAIPENLPPLTA. D y K.LKPDPNTL.C >> también tienen en común dos residuos de Leu

(L) y poseen, además, las mayores probabilidades relacionada con el potencial antioxidante. La secuencia Pro-Leu y The-Leu, cercano en la posición C-terminal, puede estar relacionada con un mayor valor de actividad antioxidante en estas secuencias (Ren et al., 2008). Además, se ha establecido que, un mayor volumen hidrofóbico en la posición C-terminal se relaciona fuertemente con la actividad antioxidante (Zou et al., 2016). Lo que en especial se cumple con estas dos secuencias. Se conoce que las propiedades electrónicas de enlace de hidrógeno y la ubicación de los aminoácidos junto con las propiedades estéricas de los residuos de aminoácidos en los extremos C y N, pueden ser la raíz de la actividad antioxidante de los péptidos completos (Zou et al., 2016). Esto sugiere que, en este caso, los aumentos de la capacidad para captar radicales $ABTS^+$, en los hidrolizados de BSA-Alcalasa obtenidos luego de tratamiento físico al sustrato, se deben a un efecto sinérgico entre las estructuras peptídicas con potencial antioxidante descritas. Sin embargo, un rol especial en la exposición de esta actividad lo deben cumplir estas dos secuencias peptídicas resaltadas.

Entre tanto las secuencias: << K.LKPDNTL.C, K.VPQVSTPTLVE.V y Q.NALIVRY.T solo presentes en las fracciones BSA_T y BSA_T+U provienen de sitios, donde la cadena de BSA posee algunos de los 17 puentes disulfuros que brindan soporte a su estructura. Esto puede sugerir que la velocidad de escisión aumenta con el tratamiento, debido a la posibilidad de acceso a zonas donde originalmente la acción de la enzima es restringida.

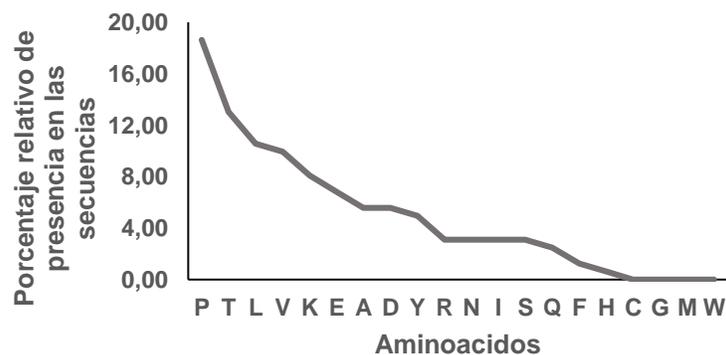


Fig. 7.6. Porcentaje de cada aminoácido del total de los 16 péptidos identificados con potencial antioxidante estimados por el meta predictor: mAHTPred.

En la Fig. 7.6, se muestra el porcentaje de aparición en número de cada aminoácido en las 16 secuencias con potencial antioxidante de la tabla 7.9. De los 20 aminoácidos naturales, cuatro de ellos no aparecen en las secuencias peptídicas descritas (C, G, M, W). M y W tienen baja frecuencia en la cadena de BSA. Como se puede ver, los aminoácidos están distribuidos desigualmente en los péptidos. Algunos por supuesto, aparecen con más frecuencia que otros. Pro, The, Leu y Val representan, por ejemplo, más del 50% del total de los residuos. Mientras que los menos frecuentes son la Gln, Phe y la His (un 5% del total de residuos, aproximadamente). Se cree que, His, Met y Cys son muy importantes para la actividad de eliminación de radicales de los péptidos debido a la capacidad para donar protones del grupo imidazol, la oxidación del sofóxido de Met y la donación de un hidrógeno del grupo SH, respectivamente. Pero lo cierto es que, los péptidos identificados

en este trabajo, tienen poca o nula presencia de estos aminoácidos. En cambio, como se mencionó que, más de la mitad de los residuos son hidrofóbicos, con alta frecuencia de Pro y Thr. Ohata et al (2016), Identificaron el péptido de <<GYP>>, que contenía dos aminoácidos hidrófobos continuos, Tyr y Pro, concluyendo que tenía una actividad de eliminación de radicales hidroxilos muy alta (97,6 %) a una concentración de relativamente bajas (Ohata et al., 2016).

7.4. CONCLUSIONES

El uso de la metodología de superficie de respuesta se puede usar con éxito en la optimización de las condiciones de hidrólisis enzimática de plasma bovino con Alcalasa. Los resultados mostraron que la temperatura es un factor importante que podría afectar la actividad antioxidante de los hidrolizados, así como el rendimiento expresado en el GH de la reacción. La condición óptima para obtener fracciones peptídicas con mayor actividad antioxidante con el mejor rendimiento posible fue de: temperatura de 57 °C, pH = 8,5 y E/S de 9,8% (m/v). Sin embargo, las más bajas relaciones capacidad antioxidante-costo de enzima, se tienen con adición de enzima en los niveles superiores (entre 9 y 10 %). Una actividad-costo mucho mayor (un 17% más que el promedio obtenidos con los niveles restantes) ocurre con los menores niveles de enzima usada, justo con GH_{max} cercanos a 19%.

En cuanto a la hidrólisis de BSA-Alcalasa sometida a tratamiento físico previo. Los resultados demostraron que es posible aumentar la eficiencia de recuperación de péptidos bioactivos a través del tratamiento térmico y con ultrasonido previo a la hidrólisis. La actividad antioxidante de las fracciones hidrolizadas ultrafiltradas menores a 3 kDa, tienen una actividad mucho mayor para los tratamientos BAS_T y BSAT+U en comparación que las fracciones obtenidas de proteína nativa o solo tratada con ultrasonido. Tres secuencias peptídicas identificadas que son comunes en estas fracciones destacadas por su mayor actividad *in vitro*, presentan valores importantes de probabilidad asociada con la actividad antioxidante (actividad *in silico*). Estos péptidos son ricos en Pro (P) y los residuos se ubican en posiciones cercanas al C-terminal del péptido.

REFERENCIAS

- Arrutia, F., Fernández, R., Menéndez, C., González, U. A., & Riera, F. A. (2017). Utilization of blood by-products: An in silico and experimental combined study for BSA usage. *Scientific Reports*, 7(1), 17250. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17029-2>
- Arrutia, F., Puente, Á., Riera, F. A., Menéndez, C., & González, U. A. (2016). Influence of heat pre-treatment on BSA tryptic hydrolysis and peptide release. *Food Chemistry*, 202, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.107>
- Beaubier, S., Framboisier, X., Fournier, F., Galet, O., & Kapel, R. (2021). A new approach for modelling and optimizing batch enzymatic proteolysis. *Chemical Engineering Journal*, 405, 126871. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126871>
- Butré, C. I., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2014). Introducing enzyme selectivity: a quantitative parameter to describe enzymatic protein hydrolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(24), 5827–5841. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8006-2>
- Cheison, S. C., Leeb, E., Toro-Sierra, J., & Kulozik, U. (2011). Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins by trypsin and potential recovery of native alpha-lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21(3), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.09.008>
- Chi, Z., Hong, B., Ren, X., Cheng, K., Lu, Y., & Liu, X. (2018). Investigation on the conformational changes of bovine serum albumin in a wide pH range from 2 to 12. *Spectroscopy Letters*, 51(6), 279–286. <https://doi.org/10.1080/00387010.2018.1471092>
- Deng, Y., van der Veer, F., Sforza, S., Gruppen, H., & Wierenga, P. A. (2018). Towards predicting protein hydrolysis by bovine trypsin. *Process Biochemistry*, 65, 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.11.006>
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296–1307. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.004>
- Doucet, D., Gauthier, S. F., Otter, D. E., & Foegeding, E. A. (2003). Enzyme-Induced Gelation of Extensively Hydrolyzed Whey Proteins by Alcalase: Comparison with the Plastein Reaction and Characterization of Interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6036–6042. <https://doi.org/10.1021/jf026041r>
- Durão, P., Bento, I., Fernandes, A. T., Melo, E. P., Lindley, P. F., & Martins, L. O. (2006). Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: structural, biochemical, enzymatic and stability studies. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(4), 514. <https://doi.org/10.1007/s00775-006-0102-0>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(5), 430–441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Figuroa, O. A., Zapata, J. E., & Sánchez, C. P. (2016). Optimización de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas de Plasma Bovino. *Información Tecnológica*, 27(2), 39–52.

<https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000200006>

- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, *118*(2), 403–410. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2009.05.013>
- Manavalan, B., Basith, S., Shin, T. H., Wei, L., & Lee, G. (2018). mAHTPred: a sequence-based meta-predictor for improving the prediction of anti-hypertensive peptides using effective feature representation. *Bioinformatics*, *35*(16), 2757–2765. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty1047>
- Marcet, I., Salvadores, M., Rendueles, M., & Díaz, M. (2018). The effect of ultrasound on the alkali extraction of proteins from eggshell membranes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(5), 1765–1772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.8651>
- Maresca, P., & Ferrari, G. (2017). Modelling of the kinetics of Bovine Serum Albumin enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure. *Food and Bioproducts Processing*, *105*, 1–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.03.006>
- Márquez, M. C., & Vázquez, M. A. (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, *35*(1–2), 111–117. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00041-2)
- Morales-Medina, R., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2017). Multiobjective optimization of the antioxidant activities of horse mackerel hydrolysates produced with protease mixtures. *Process Biochemistry*, *52*, 149–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.001>
- Morales-Medina, R., Tamm, F., Guadix, A. M., Guadix, E. M., & Drusch, S. (2016). Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. *Food Chemistry*, *194*, 1208–1216. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.122>
- Murayama, K., & Tomida, M. (2004). Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, *43*(36), 11526–11532. <https://doi.org/10.1021/bi0489154>
- Ohata, M., Uchida, S., Zhou, L., & Arihara, K. (2016). Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. *Food Chemistry*, *194*, 1034–1039. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.089>
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, *1*(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Rami Tzafiriri, A., & Edelman, E. R. (2007). Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the {Michaelis}–{Menten} constant. *Journal of Theoretical Biology*, *245*(4), 737–748. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.12.005>
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., & Xue, S. J. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, *108*(2), 727–736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.010>
- Schechter, I., & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical*

- and Biophysical Research Communications*, 27(2), 157–162.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(67\)80055-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80055-X)
- Shi, D., He, Z., & Qi, W. (2005). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, 40(5), 1943–1949.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.009>
- Song, R., Liang, T., Shen, Q., Liu, J., Lu, Y., Tang, C., Chen, X., Hou, T., & Chen, Y. (2020). The optimization of production and characterization of antioxidant peptides from protein hydrolysates of *Agrocybe aegerita*. *LWT*, 134, 109987.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109987>
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143–2196.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.060>
- Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.011>
- Umego, E. C., He, R., Ren, W., Xu, H., & Ma, H. (2021). Ultrasonic-assisted enzymolysis: Principle and applications. *Process Biochemistry*, 100, 59–68.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.033>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258–264.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Watchararuj, K., Goto, M., Sasaki, M., & Shotipruk, A. (2008). Value-added subcritical water hydrolysate from rice bran and soybean meal. *Bioresource Technology*, 99(14), 6207–6213.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.12.021>
- Wen, C., Zhang, J., Feng, Y., Duan, Y., Ma, H., & Zhang, H. (2020). Purification and identification of novel antioxidant peptides from watermelon seed protein hydrolysates and their cytoprotective effects on H₂O₂-induced oxidative stress. *Food Chemistry*, 327, 127059.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127059>
- Yang, J., Huang, J., Zhu, Z., & Huang, M. (2020). Investigation of optimal conditions for production of antioxidant peptides from duck blood plasma: response surface methodology. *Poultry Science*, 99(12), 7159–7168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.060>
- Zhao, W., Shu, Q., He, G., & Qihe, C. (2020). Reducing antigenicity of bovine whey proteins by *Kluyveromyces marxianus* fermentation combined with ultrasound treatment. *Food Chemistry*, 311, 125893. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125893>
- Zhu, L., Xiong, H., Huang, X., Guyonnet, V., Ma, M., Chen, X., Zheng, Y., Wang, L., & Hu, G. (2022). Identification and molecular mechanisms of novel antioxidant peptides from two sources of eggshell membrane hydrolysates showing cytoprotection against oxidative stress: A combined in silico and in vitro study. *Food Research International*, 157, 111266.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111266>
- Zou, T. B., He, T. P., Li, H. B., Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship

of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21, 1 – 14.
<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85045189905&partnerID=40&md5=41fef4c003bd9ced261cdda7e935da17>

CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo fundamental analizar los mecanismos cinéticos asociados a la hidrólisis enzimática de proteínas de sangre bovino y su relación con la actividad biológica de los hidrolizados obtenidos. Dos enfoques complementarios se abordaron para el logro de las metas del trabajo. El primero implica la utilización de técnicas analíticas *in vitro* en el análisis del potencial antioxidante (FRAP, ABTS, ORAC, quelante de Fe) e inhibidor de la ACE expresado por los hidrolizados de sangre bovino con Alcalasa. El segundo se relaciona con el modelamiento matemático de las reacciones de hidrólisis enzimática de proteína. Se estudió el comportamiento cinético a través de las curvas de hidrólisis, con el uso y verificación de modelos empíricos y modelos de fundamento cinético y conceptual, para la comprensión de aspectos operativos en la mejora de las condiciones de funcionamiento tendientes a maximizar los rendimientos de la reacción y disminuir los costos relacionados con la enzima. De igual forma, se emplearon los modelos de balance de población, adaptados como novedad a un proceso de hidrólisis al azar de enlaces peptídicos en una secuencia proteica para predecir la distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de BSA bovina, obtenidos con distintas condiciones de temperatura y sustrato inicial.

Como parte de los objetivos específicos, se analizó la influencia de la concentración de enzima y sustrato en el comportamiento cinético de la hidrólisis enzimática mediante la utilización de Alcalasa 2,4 L y proteínas de sangre bovino como sustrato en la reacción. La evidencia científica sugiere que, en las reacciones de hidrólisis de proteínas, se suele emplear soluciones con baja concentración de sustrato, es decir, menos del 10% (p/v) de proteína. A pesar de que una concentración de proteínas más alta, por ejemplo, del 30%, reduciría el uso de agua en los procesos industriales. De forma general, se ha observado que al incrementar la concentración del sustrato se produce una disminución en la tasa de hidrólisis. Las razones por las cuales esto ocurre no están suficientemente claras (Butré et al., 2014). Dos estrategias se plantearon en este trabajo, con la finalidad de comprender los efectos limitantes de la concentración de sustrato y enzima sobre la producción de fracciones (péptidos) de interés antioxidante y antihipertensivo.

En una primera aproximación (capítulo 3), se estudió el impacto que tienen los niveles de sustrato y enzima en la actividad antioxidante y el GH de HPB enteros y ultrafiltrados con membranas de diferentes tamaños utilizando Alcalasa 2,4 L. Se emplearon técnicas de análisis *in vitro*, incluyendo FRAP, ABTS y ORAC, utilizando un diseño novedoso de medidas repetidas en el tiempo de hidrólisis para recolectar muestras en el mismo sistema de reacción a medida que el tiempo avanza, sin el riesgo de imprimir sesgo a los resultados obtenidos. De esta forma, se evaluaron los niveles de sustrato y enzima de manera independiente y se analizó su relación con la capacidad antioxidante a diferentes grados de hidrólisis (GHs). Para todas las combinaciones de niveles S_0 (5, 10 y 20 g/L); E_0 (150, 300 y 600 mg/L) y actividades analizadas (FRAP Y ABTS), no parece existir una relación lineal entre el GH y la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas. A pesar de que, en todos los casos, la hidrólisis se relaciona con el aumento de la actividad antioxidante. La exposición de esta actividad es debida al efecto sinérgico de una gran variedad de péptidos distintos (de diferentes tamaños moleculares y característica química distinta), los cuales aparecen y desaparecen en el tiempo, con cinéticas de producción diferentes.

Cuando empleamos la mayor cantidad de enzima en el proceso de hidrólisis (600 mg/mL) no siempre se garantiza una mayor actividad en las fracciones peptídicas obtenidas, aunque siempre resulta en un aumento del GH. En cambio, al utilizar una cantidad intermedia de enzima (300 mg/mL), se observa una mayor actividad antioxidante (FRAP y ABTS) en los hidrolizados, aunque el GH final sea significativamente menor en comparación con el uso de más cantidad de enzima para el mismo tiempo. Respecto a la concentración del sustrato, aunque la velocidad de escisión de enlaces es mayor cuando se hidroliza un sistema con una baja concentración de sustrato (5 g/L), en realidad se obtienen mejores resultados de actividad antioxidante relativa cuando se opera el sistema con una carga de sustrato intermedia (10 g/L), que se corresponde con el K_M para el sistema de reacción plasma bovino-Alcalasa.

Este diseño experimental, a pesar de evaluar de forma independiente los efectos de la enzima y el sustrato, sugería cambios en la relación E/S. Si se analiza el modelo clásico de Michaelis-Menten, se deduce que no debería existir efecto alguno sobre la velocidad hidrólisis de proteínas cuando se mantiene una relación E/S constante en el sistema reaccionante. Sin embargo, se ha encontrado que, en algunos sistemas de reacción, la tasa de hidrólisis tiende a ser menor a medida que aumenta la concentración de sustrato inicial en el sistema de reacción. Por lo que es claro que la influencia de la concentración de sustrato sobre la máxima capacidad de hidrólisis parece no ser un fenómeno asociado exclusivamente al sustrato.

Teniendo en cuenta esto, en la segunda alternativa (capítulo 4), se analizó cómo la concentración inicial de proteína afecta el proceso de hidrólisis y la producción de fracciones peptídicas con propiedades antioxidantes y antihipertensivas utilizando plasma bovino desalado y Alcalasa, manteniendo constante la relación enzima-sustrato. Se evaluaron el GH, el tamaño de los péptidos, las propiedades antioxidantes y la identificación las secuencias de péptidos obtenidos para cada concentración de sustrato evaluada. Se analizaron también, los potenciales antihipertensivos, *in vitro e in silico*, de los péptidos obtenidos. Al mismo tiempo, se intentó explicar los fenómenos bioquímicos asociados a la ruptura de enlaces y la formación de péptidos de interés en las condiciones de reacción mencionada. El experimento consistió en hidrolizar plasma bovino a diferentes concentraciones de sustrato inicial (5, 10,15 y 20 g/L de proteína) y una relación E:S=1:25 hasta un GH=19%. Las fracciones ultrafiltrada menor de 3 kDa y que se presumen responsables de la actividad antioxidante e inhibidoras de la ECA, se evaluaron *in vitro* y se identificaron por UHPLC y Q-TOF-MS. Herramientas *in silico* de análisis basadas en QSAR y acoplamiento molecular se usaron como medio para verificar, en un segundo nivel de profundidad, el potencial antihipertensivo de las los péptidos obtenidos y su relación con las condiciones de operación (niveles de sustrato) usadas. Los resultados indican que, para obtener péptidos con un tamaño reducido, es más recomendable someter las proteínas de plasma a hidrólisis con Alcalasa después de dializar. Aunque en este estudio no se ha esclarecido la naturaleza de los inhibidores presentes en el plasma crudo, se cree que la presencia de sales podría afectar la velocidad de las reacciones enzimáticas y disminuir el rendimiento de la hidrólisis. Por otra parte, el incremento en la concentración de proteína inicial en el reactor, manteniendo la relación enzima-sustrato constante, dio como resultado una mezcla de péptidos con mayor tamaño y una composición de aminoácidos ligeramente diferente; lo cual sugiere cambios en la selectividad enzimática. Como

consecuencia, los hidrolizados exhibieron distintas propiedades antioxidantes y antihipertensivas.

El hidrolizado con los péptidos más pequeños demostró una mayor capacidad antihipertensiva, ya que estos péptidos tienen la capacidad de interactuar con el estrecho centro activo de la enzima ACE. El hidrolizado con la mayor concentración de Pro, Gly y Ser presentó mejores propiedades antioxidantes. Esto implica que la modulación de la bioactividad de los hidrolizados puede llevarse a cabo de manera fácil y económica a través de cambios en la concentración inicial de sustrato.

La hidrólisis de proteínas es un proceso altamente complejo, especialmente debido a la gran variedad de posibilidades de disposición de los 20 aminoácidos en la cadena proteica. Aunque la enzima tiene la capacidad teórica de romper todos los enlaces con los cuales tiene afinidad, factores externos como el pH, la temperatura y la relación enzima/sustrato (E/S) pueden influir en la eficacia de esta ruptura. Además, la naturaleza diversa y reactiva de los sustratos, como las matrices alimentarias y los subproductos proteicos no purificados, agrega otra capa de complejidad a la alta variabilidad fisicoquímica cualitativa y cuantitativa resultante de la hidrólisis.

De otro lado, el enfoque de modelamiento matemático se utilizó en tres dimensiones: 1) para analizar posibles fenómenos de inhibición en la reacción de hidrólisis de plasma bovino (modelos cinéticos conceptuales); 2) para predecir la distribución de pesos moleculares en un proceso de ruptura (hidrólisis enzimática al azar) para distintas temperaturas y sustratos iniciales (modelos de población); 3) para maximizar la obtención de fracciones antioxidantes con menor costo asociado (modelos empíricos).

Se planteó y validó un modelo cinético, basado en los mecanismos de inhibición por efectos del sustrato y producto, y la desactivación térmica de la enzima en presencia del sustrato (capítulo 5). El objetivo fue examinar el posible efecto de los fenómenos de inhibición en la producción de péptidos con potencial bioactivo en condiciones variables de sustrato inicial, manteniendo la relación E/S sustrato fija. La inhibición se evaluó experimentalmente mediante la adición de productos de pesos moleculares de tamaño controlado y el análisis de la influencia de la concentración de péptidos inhibidores sobre la capacidad de la enzima (Alcalasa 2.4L) para escindir enlaces peptídicos de proteínas de plasma bovino. El modelo propone una expresión variable de los parámetros de inhibición, basada en los cambios cinéticos de los perfiles de productos para cada tiempo de reacción en cada condición de operación evaluada en el estudio. Fracciones peptídicas con tamaños moleculares intermedios (Fracción 10-3 kDa) tiene un mayor efecto inhibitorio sobre la alcalasa a $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $\text{pH}=9.0$. Los efectos de inhibición difieren de acuerdo con la concentración de sustrato inicial, cuando se conserva la relación E/S en el sistema de reacción. Un mayor efecto inhibitorio debido a los productos, se presenta cuando la reacción ocurre con una mayor carga de sustrato inicial ($S_0=20\text{ g/L}$). Para una relación (E/S) fija, las constantes de inhibición tienen relación con la conversión del sustrato, esto se explica porque péptidos de naturaleza fisicoquímica variada aparecen y desaparecen en el tiempo a medida que la reacción avanza, hasta lograr un conjunto de péptidos distintos y en concentraciones relativas también variadas, para cada nivel de sustrato usado. Esta comunidad de péptidos ejerce distinta acción inhibitoria frente a la alcalasa en cada condición de operación.

Por otro lado, se utilizó la estrategia de solución de problemas de equilibrio poblacional inverso,

en la definición de un modelo de población para la degradación enzimática de una proteína usando información experimental de distribución de pesos moleculares de hidrolizados enzimáticos de BSA bovino para distintas temperaturas y concentraciones de sustrato inicial (capítulo 6). Se planteó con éxito un modelo de balance de población que predice con bastante precisión la distribución de pesos moleculares de una reacción de hidrólisis de alcalasa-BSA bovina para diferentes temperaturas y sustratos iniciales. Este modelo puede ser usado para comprender los fenómenos de ruptura asociados a la cinética de escisión de los enlaces peptídicos por alcalasa y pueden ser potencialmente aplicados como herramienta en el estudio de la obtención de péptidos bioactivos.

Para finalizar, se desarrolló una estrategia centrada en la recuperación de fracciones y unidades peptídicas con actividad antioxidante derivadas de la hidrólisis de plasma bovino y BSA con alcalasa (capítulo 7). Por un lado, se realizó un análisis que relaciona los costos asociados a la enzima en un proceso de producción por lotes. El efecto de la T, el pH y el costo implícito en la cantidad de enzima se consideró en este estudio. Esto debido a la importancia de estos elementos en el desarrollo de una estrategia de producción industrial. Adicionalmente, se ejecutó un diseño para evaluar la recuperación eficiente de fracciones y péptidos de interés antioxidante a partir de la hidrólisis de BSA, representativa por ser la proteína en mayor proporción relativa en el plasma bovino. El análisis pasa por comprender posibles aspectos limitantes del uso de BSA como precursora de péptidos antioxidantes y proponer la utilización de tratamientos físicos (térmicos y ultrasonidos) para la modificación de su estructura y mejorar la recuperación de unidades peptídicas de interés. Los resultados indican que la condición óptima para obtener fracciones peptídicas, hidrolizadas de plasma bovino con alcalasa, con la mayor actividad antioxidante y el mejor rendimiento posible en la reacción es: $T = 57\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 8,5$ y $E/S = 9,8\%$. Sin embargo, las más bajas relaciones capacidad antioxidante-costo de enzima se tienen con adición de enzima en los niveles superiores (entre 9 y 10 %). Una actividad-costo mucho mayor (un 17% más que el promedio obtenidos con los niveles restantes) ocurre con los menores niveles de enzima usada, justo con GH_{max} cercanos a 19%.

En cuanto a la hidrólisis de BSA-Alcalasa sometida a tratamiento físico previo. Los resultados demostraron que es posible aumentar la eficiencia de recuperación de péptidos bioactivos a través del tratamiento térmico y con ultrasonido previo a la hidrólisis. La actividad antioxidante de las fracciones hidrolizadas ultrafiltradas menores a 3 kDa, tienen una actividad mucho mayor para los tratamientos BAS_T y BSAT+U en comparación que las fracciones obtenidas de proteína nativa o solo tratada con ultrasonido. Tres secuencias peptídicas identificadas que son comunes en estas fracciones destacadas por su mayor actividad in vitro, presentan valores importantes de probabilidad asociada con la actividad antioxidante. Estos péptidos son ricos en Pro (P) y los residuos que se ubican en posiciones cercanas al C-terminal del péptido.

PERSPECTIVAS FUTURAS

La búsqueda de péptidos bioactivos, se ha llevado a cabo generalmente por hidrólisis de proteínas de diferentes fuentes con diferentes enzimas, cambiando las condiciones de operación para maximizar la obtención de péptidos bioactivos. Recientemente se han evaluado procesos físicos para mejorar la probabilidad de obtener péptidos bioactivos por hidrólisis enzimática, entre otros, se han investigado extracción asistida por microondas, ultrasonido, calentamiento óhmico, campos eléctricos pulsados e hidrólisis de agua subcrítica (Zaky et al., 2022). Sin embargo, se requiere más investigación en este campo, además, sobre la relación estructura-actividad, calificación de bioactividad, estabilidad de la actividad peptídica y sus factores reguladores. Asimismo, investigar la biodisponibilidad y farmacocinética de péptidos bioactivos y realizar estudios preclínicos y clínicos, para determinar qué niveles son beneficiosos para la salud, su relación dosis-respuesta (Zaky et al., 2022).

Por otro lado, el uso de técnicas *in silico* para investigar péptidos bioactivos es prometedor, ya que reduce el costo económico, el gasto de tiempo y elimina el factor aleatorio que involucran los métodos convencionales. A pesar de las limitaciones que tienen las bases de datos, ya que algunos péptidos podrían permanecer ocultos si no se incluyen en una base de datos, la metodología *in silico* muestra el camino a seguir para seleccionar la proteasa adecuada a un sustrato proteico específico y producir secuencias dadas, probar sus mecanismos de acción (acoplamiento molecular) y probar su actividad biológica. Sin embargo, este comportamiento teórico debe ser respaldado por estudios *in vitro* e *in vivo*. Por ello, han surgido los llamados métodos híbridos o integrados, que mezclan los enfoques convencionales e *in silico* (Peredo-Lovillo et al., 2022).