

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**TRANSFORMACIÓN DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EN  
HIDROLIZADOS DE ALTO VALOR TECNOLÓGICO  
EMPLEANDO ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL  
INMOVILIZADAS**

Lic. Emilse Camila López

Director de Tesis: Dr. Guillermo A. Sihufe

Co-Director de Tesis: Dr. Ricardo M. Manzo

Lugar de realización: Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química  
(INTEC, UNL-CONICET)

**2025**

## **AGRADECIMIENTOS**

A a todas las personas e instituciones que contribuyeron, de una u otra forma, a la realización de este trabajo de tesis.

A mis directores por su guía, paciencia, apoyo constante y valiosas sugerencias a lo largo de todo este proceso.

A los integrantes del jurado de tesis, por el tiempo dedicado a la lectura y evaluación de este trabajo.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por su acompañamiento institucional y por brindarme la formación académica necesaria durante el trayecto de la carrera de posgrado.

Al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química por proporcionarme el espacio de trabajo, los recursos, el equipamiento y el apoyo técnico indispensables para el desarrollo experimental de esta tesis.

Al CONICET por el apoyo financiero a través de la beca otorgada, sin la cual este trabajo no habría sido posible.

A mi familia por su amor incondicional, por acompañarme siempre, y por enseñarme con su ejemplo el valor del trabajo, la honestidad y el esfuerzo.

A todos ellos, gracias por hacer posible este camino.

## **APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS**

### *Artículos publicados en revistas científicas*

Eberhardt, A., López, E. C., Ceruti, R. J., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2019). Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey protein hydrolysates using *Alcalase*®. *International Journal of Dairy Technology*, 72(4), 573-584. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12606>

Eberhardt, A., López, E. C., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2021). Whey protein hydrolysis with microbial proteases: Determination of kinetic parameters and bioactive properties for different reaction conditions. *International Journal of Dairy Technology*, 74(3), 489-504. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12795>

López, E. C., Eberhardt, A., Marino, F., Mammarella, E. J., Sihufe, G. A., & Manzo, R. M. (2022). Physicochemical characterisation of ACE-inhibitory and antioxidant peptides from *Alcalase*® whey protein hydrolysates using fractionation strategies. *International Journal of Dairy Technology*, 75(3), 538-552. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12872>

Eberhardt, A., Niizawa, I., López, E., Rossi, Y., Montenegro, M., Mammarella, E., Manzo, R. & Sihufe, G. (2024). Production of whey protein ingredients with improved bioactivity based on single and sequential enzymatic hydrolysis reactions. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*. <https://doi.org/10.1007/s43393-024-00318-z>

## ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	9
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUCCIÓN .....	19
1.1. Industria láctea y producción de suero .....	19
1.2. Aprovechamiento del lactosuero .....	20
1.3. Péptidos bioactivos.....	21
1.3.1. Fuente de péptidos bioactivos .....	21
1.3.2. Obtención de péptidos bioactivos .....	22
1.3.3. Caracterización y purificación de péptidos bioactivos .....	23
1.4. Enzimas .....	23
1.4.1. Proteasas.....	24
1.4.1.1. Alcalase® y Flavourzyme® .....	25
1.4.2. Caracterización de enzimas .....	27
1.5. Inmovilización.....	27
1.5.1. Métodos de inmovilización .....	28
1.5.1.1. Adsorción física.....	28
1.5.1.2. Adsorción iónica, hidrofóbica y por afinidad.....	30
1.5.1.3. Enlaces disulfuro y enlaces metálicos .....	31
1.5.1.4. Entrampamiento .....	32
1.5.1.5. Encapsulación.....	32
1.5.1.6. Enlace covalente.....	32
1.5.1.7. Reticulación.....	34
1.5.2. Soportes.....	35
1.5.2.1. Soportes inorgánicos .....	35
1.5.2.2. Soportes orgánicos .....	36
1.5.3. Modificación y activación de soportes .....	37
1.5.4. Efectos de la inmovilización .....	41

1.6.	Escalado de procesos hidrolíticos enzimáticos .....	41
1.7.	Consideraciones finales.....	45
2.	OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	48
2.1.	Objetivo general .....	48
2.2.	Objetivos específicos.....	48
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	50
3.1.	Materiales.....	50
3.2.	Caracterización bioquímica, funcional y cinética de <i>Alcalase</i> ® y <i>Flavourzyme</i> ® en estado libre .....	51
3.2.1.	Determinación de la actividad enzimática.....	51
3.2.2.	Estudios de temperatura y pH óptimos.....	53
3.2.3.	Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH.....	53
3.2.3.1.	Parámetros de inactivación.....	54
3.2.4.	Estudios cinéticos.....	60
3.2.5.	Estudios de productividad .....	61
3.2.6.	Efecto de la adición de iones metálicos sobre la actividad enzimática .....	61
3.3.	Estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con <i>Alcalase</i> ® en estado libre .....	62
3.3.1.	Preparación del WPC-80 .....	63
3.3.2.	Hidrólisis del WPC-80 .....	63
3.3.3.	Determinación del grado de hidrólisis.....	64
3.3.4.	Caracterización de los hidrolizados obtenidos .....	65
3.3.4.1.	Análisis de propiedades biológicas de interés .....	65
3.3.4.1.1.	Actividad antioxidante .....	65
3.3.4.1.2.	Actividad antihipertensiva.....	67
3.3.4.1.3.	Actividad antimicrobiana .....	68
3.3.4.2.	Estudio de las características fisicoquímicas de los péptidos involucrados en la actividad biológica de los hidrolizados mediante estrategias separativas .....	69
3.3.4.2.1.	Cromatografía de filtración en gel (GFC) .....	69
3.3.4.2.2.	Cromatografía de intercambio aniónico débil (IEC-DEAE) .....	70

3.3.4.2.3.	Cromatografía de intercambio aniónico fuerte (IEC-Q) .....	71
3.3.4.2.4.	Cromatografía de intercambio catiónico fuerte (IEC-SP) .....	71
3.3.4.2.5.	Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) .....	72
3.3.4.2.6.	Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC).....	73
3.3.4.3.	Determinación del contenido proteico .....	73
3.4.	Estudios de inmovilización .....	74
3.4.1.	Determinación del contenido proteico .....	74
3.4.2.	Determinación de la actividad enzimática.....	74
3.4.3.	Obtención de las partículas de quitosano .....	75
3.4.3.1.	Caracterización física inicial de las partículas.....	75
3.4.4.	Proceso de inmovilización .....	76
3.4.4.1.	Evaluación de distintas técnicas de inmovilización .....	76
3.4.4.2.	Evaluación de la influencia de distintas concentraciones de agente activante .....	79
3.4.4.3.	Análisis del efecto del tiempo de inmovilización.....	80
3.4.4.4.	Parámetros de inmovilización .....	81
3.5.	Caracterización bioquímica, funcional y cinética de <i>Alcalase</i> ® y <i>Flavourzyme</i> ® en estado inmovilizado .....	83
3.5.1.	Estudios de temperatura y pH óptimos.....	84
3.5.2.	Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH .....	84
3.5.3.	Estudios de estabilidad operacional .....	85
3.5.4.	Evaluación de la estabilidad durante el almacenamiento .....	85
3.5.5.	Estudios cinéticos.....	85
3.6.	Evaluación tecnológica de los hidrolizados obtenidos empleando los derivados sintetizados .....	86
3.6.1.	Preparación del WPC-80 .....	86
3.6.2.	Pruebas preliminares .....	86
3.6.3.	Obtención cuantitativa de hidrolizados .....	87
3.6.3.1.	Métodos de secado aplicados: liofilización y aspersión.....	88
3.6.4.	Caracterización de los hidrolizados.....	88
3.6.4.1.	Análisis termogravimétrico (TGA) .....	89

3.6.4.2.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) .....	89
3.6.4.3.	Humedad .....	90
3.6.4.4.	Microscopía electrónica de barrido .....	90
3.6.4.5.	RP-HPLC .....	90
3.6.4.6.	Hidrofobicidad superficial.....	90
3.6.4.7.	Índice de humectabilidad o mojabilidad .....	91
3.6.4.8.	Rendimiento de secado.....	91
3.6.4.9.	Solubilidad .....	91
3.6.4.10.	Actividad antioxidante .....	92
3.7.	Análisis estadístico.....	92
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	94
4.1.	Caracterización bioquímica, funcional y cinética de <i>Alcalase</i> ® y <i>Flavourzyme</i> ® en estado libre .....	94
4.1.1.	Estudios de temperatura y pH óptimos.....	94
4.1.2.	Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH.....	96
4.1.3.	Estudios cinéticos.....	106
4.1.4.	Estudios de productividad .....	109
4.1.5.	Efecto de la adición de iones metálicos sobre la actividad enzimática .....	110
4.2.	Estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con <i>Alcalase</i> ® en estado libre .....	112
4.2.1.	Hidrólisis del WPC-80 .....	113
4.2.2.	Caracterización de los hidrolizados obtenidos .....	113
4.2.2.1.	Análisis de las propiedades biológicas de interés.....	113
4.2.2.2.	Efecto del fraccionamiento de los hidrolizados sobre la actividad biológica.....	116
4.2.2.2.1.	Cromatografía de filtración en gel.....	119
4.2.2.2.2.	Cromatografía de intercambio iónico.....	121
4.2.2.2.3.	Cromatografía de interacción hidrofóbica.....	128
4.2.2.2.4.	RP-HPLC .....	131
4.3.	Estudios de inmovilización .....	133
4.3.1.	Caracterización de las partículas .....	133

4.3.2.	Proceso de inmovilización .....	137
4.3.2.1.	Evaluación de distintas técnicas de inmovilización .....	137
4.3.2.2.	Evaluación de la influencia de distintas concentraciones de agente activante .....	141
4.3.2.3.	Análisis del efecto del tiempo de inmovilización.....	148
4.4.	Caracterización bioquímica, funcional y cinética de <i>Alcalase</i> ® y <i>Flavourzyme</i> ® en estado inmovilizado .....	154
4.4.1.	Estudios de temperatura y pH óptimos.....	154
4.4.2.	Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH.....	157
4.4.3.	Estudios de estabilidad operacional .....	173
4.4.4.	Evaluación de la estabilidad durante el almacenamiento .....	174
4.4.5.	Estudios cinéticos.....	176
4.5.	Evaluación tecnológica de los hidrolizados obtenidos empleando los derivados sintetizados.....	179
4.5.1.	Obtención cuantitativa de hidrolizados .....	180
4.5.1.1.	Pruebas preliminares .....	180
4.5.1.2.	Obtención cuantitativa de hidrolizados .....	182
4.5.2.	Caracterización de los hidrolizados.....	183
4.5.2.1.	Análisis termogravimétrico (TGA) .....	183
4.5.2.2.	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fournier (FT-IR) .....	187
4.5.2.3.	Humedad .....	191
4.5.2.4.	Microscopía electrónica de barrido .....	193
4.5.2.5.	RP-HPLC .....	198
4.5.2.6.	Hidrofobicidad superficial.....	199
4.5.2.7.	Índice de humectabilidad o mojabilidad .....	202
4.5.2.8.	Rendimiento de secado.....	204
4.5.2.9.	Solubilidad .....	206
4.5.2.10.	Actividad antioxidante .....	208
5.	CONCLUSIONES .....	212
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	219
7.	ANEXOS.....	253

Anexo 1. Materiales y métodos. Caracterización bioquímica, funcional y cinética de <i>Alcalase</i> ® y <i>Flavourzyme</i> ® en estado libre .....	253
Anexo 2. Materiales y métodos. Estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con <i>Alcalase</i> ® en estado libre .....	254
Anexo 3. Materiales y métodos. Estudios de inmovilización .....	255
Anexo 4. Resultados y discusión. Caracterización de <i>Alcalase</i> ® y <i>Flavourzyme</i> ® en estado libre	256
Anexo 5. Resultados y discusión. Estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con <i>Alcalase</i> ® en estado libre .....	266
Anexo 6. Resultados y discusión. Estudios de inmovilización .....	276
Anexo 7. Resultados y discusión. Caracterización bioquímica, funcional y cinética de <i>Alcalase</i> ® y <i>Flavourzyme</i> ® en estado inmovilizado .....	279

**LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

<b>Abreviatura y/o símbolo</b>	<b>Significado</b>
AAH	Actividad antihipertensiva
AAM	Actividad antimicrobiana
AAO	Actividad antioxidante
ABTS	Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
ABTS <sup>+</sup>	Radical de la sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AE	Actividad teórica específica
AE <sub>q</sub>	Actividad teórica equivalente
ANOVA	Análisis de la varianza
ANSA	Ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico
A <sub>r</sub>	Actividad residual
AR	Actividad re relativa
AU	Unidades de absorbancia
BC	<i>Bacillus cereus</i> DBFIQ B 7
BCA	Sal disódica del ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
CLEA	Agregados enzimáticos reticulados o <i>Cross-Linked Enzyme Aggregates</i>
CS	<i>Cronobacter sakazakii</i> DBFIQ CS 1
DH	Grado de hidrólisis
EC	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
FA	Fracciones agrupadas
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GFC	Cromatografía de filtración por geles

HHL	Hipuril-L-histidil-L-leucina
HIC	Cromatografía de interacción hidrofóbica
IEC-DEAE	Cromatografía de intercambio aniónico débil
IEC-Q	Cromatografía de intercambio aniónico fuerte
IEC-SP	Cromatografía de intercambio catiónico fuerte
LM	<i>Listeria monocytogenes</i> DBFIQ LM 24
MPC	Concentrado de proteína láctea
MWCO	Corte por peso molecular
$\eta_a$	Rendimiento de inmovilización, en términos de actividad
$\eta_p$	Rendimiento de inmovilización, en términos de proteína
$P_r$	Proteína residual
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa
SA	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> ATCC 29213
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEAC	Capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox, es decir que, una solución de 50 TEAC presenta la misma actividad antioxidante que una solución 50 $\mu$ M de Trolox
TFA	Ácido trifluoroacético
TGA	Análisis termogravimétrico
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
TT	2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina
UI	$\mu$ moles de L-tirosina liberados por min
WPC-22/WPC-29	Control sin enzima del WPH-22/WPH-29: proteína de suero incubada bajo las mismas condiciones que WPH-22/WPCH29, pero sin <i>Alcalase</i> ®
WPC7%/WPC8%	Solución de concentrado de proteínas de suero lácteo al 7% (m/v)/8% (m/v) de proteínas
WPC-80	Concentrado de proteínas de suero lácteo 80 (80 g de proteína por 100 g de muestra)

---

*Abreviaturas y símbolos*

---

WPH	Hidrolizado de proteínas de suero lácteo
WPH-22/WPH-29	Hidrolizado de proteínas de suero lácteo con <i>Alcalase</i> ® en estado libre, con grado de hidrólisis del 22,1%/29,1%
WPH-A	Hidrolizado de proteínas de suero lácteo obtenido por hidrólisis enzimática con <i>Alcalase</i> ® inmovilizada
WPH-AF	Hidrolizado de proteínas de suero lácteo obtenido por hidrólisis mediante combinación enzimática secuencial, primero con <i>Alcalase</i> ® inmovilizada y luego con <i>Flavourzyme</i> ® inmovilizada
WPH-C	Sobrenadante obtenido a partir de la centrifugación (10.000 × g, 10 min, 4°C) de una muestra específica de hidrolizado, preparada a una concentración de 4% (m/v)
WPH-CF	Muestra específica de hidrolizado [4% (m/v)] que ha sido centrifugada (10.000 ×g, 10 min, 4°C) y filtrada (0,45 μm)
WPH-P	Precipitado remanente obtenido a partir de la centrifugación (10.000 × g, 10 min, 4°C) de una muestra específica de hidrolizado, preparada a una concentración de 4% (m/v)
WPI	Aislado de proteína de suero
α-LA	α-lactoalbúmina
β-LG	β-lactoglobulina

## RESUMEN

En un país con una industria láctea consolidada y una fuerte producción quesera, el aprovechamiento del suero, un subproducto industrial, representa una línea de investigación clave desde la perspectiva ambiental. Este subproducto no solo es nutricionalmente valioso, sino que también ha demostrado poseer destacadas propiedades tecnofuncionales y biológicas, las cuales son de gran interés, tanto para mejorar la salud humana como para enriquecer la calidad de productos alimentarios. En este contexto, el estudio de biocatalizadores insolubilizados resulta fundamental para promover la producción sostenible y a gran escala de compuestos de interés nutricional y funcional.

Para ello, resulta crucial realizar una caracterización inicial de los biocatalizadores en su forma libre y evaluar su desempeño hidrolítico antes de cualquier proceso de inmovilización. En este sentido, se llevaron a cabo estudios bioquímicos, funcionales y cinéticos de dos enzimas: *Alcalase*® y *Flavourzyme*®. Durante esta caracterización, en la que se utilizó caseína como sustrato, se observó que los mejores rendimientos de hidrólisis se lograron a 65-70°C y pH 8,5-9,5 para *Alcalase*®, y a 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®. Las estabilidades térmicas de ambas enzimas se destacaron a 50-65°C para *Alcalase*® y a 40-45°C para *Flavourzyme*®, mientras que sus estabilidades frente al pH fueron mayores en el rango de pH 6-8,5 para *Alcalase*® y a pH 6,5 y 8 para *Flavourzyme*®. Además, el aumento en la  $K_{0,5}$  sugirió una posible inhibición por producto. En los procesos hidrolíticos de larga duración, se evidenció que el aumento de la temperatura, el tiempo y el pH (hasta valores óptimos) favorecían la actividad catalítica. Por su parte, el estudio del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática subrayó la importancia de evaluar cada ion y su concentración de manera específica.

Debido a la mayor capacidad de escisión de enlaces peptídicos demostrada por *Alcalase*® en comparación con *Flavourzyme*®, y considerando sus distintas actividades catalíticas, se optó por utilizar únicamente *Alcalase*® en estado libre para los estudios hidrolíticos con el subproducto industrial: concentrado de proteínas de suero lácteo. Este biocatalizador permitió obtener dos hidrolizados con altos grados de hidrólisis (22,1 y 29,1%), los cuales presentaron efectos antioxidantes y antihipertensivos significativamente superiores a los controles, aunque no mostraron efectos antimicrobianos relevantes. Los estudios no solo incluyeron el análisis de las bioactividades de los hidrolizados obtenidos, sino que también involucraron fraccionamientos mediante técnicas cromatográficas. Estos métodos contribuyeron al entendimiento de los hidrolizados, complementando así los conocimientos previos del grupo de investigación. Los efectos antioxidantes observados se asociaron con la presencia de residuos cargados negativamente y residuos hidrofóbicos alifáticos, mientras que las propiedades antihipertensivas

mostraron una mayor relación con residuos cargados e hidrofóbicos aromáticos. Además, las bioactividades evaluadas se asociaron con compuestos de bajo peso molecular (<1 kDa).

Durante el proceso de inmovilización de los biocatalizadores, se evaluaron diversas técnicas y concentraciones de agente activante y la influencia del tiempo de incubación sobre los rendimientos de inmovilización. Los estudios revelaron bajos rendimientos cuando se emplearon métodos basados en adsorción al quitosano o en reticulación, en contraste con los buenos resultados obtenidos mediante la inmovilización covalente entre quitosano y las enzimas, utilizando glutaraldehído como agente activante. El uso de distintas concentraciones de glutaraldehído mostró que a bajas concentraciones se obtienen menores rendimientos, debido a la escasa disponibilidad de grupos funcionales capaces de reaccionar con los grupos específicos de las enzimas, lo que favorece la lixiviación o pérdida de las moléculas enzimáticas. En cambio, concentraciones más altas permiten una mayor cantidad de enlaces entre el biocatalizador y el soporte, reduciendo la fuga de la enzima. No obstante, un exceso de agente activante también puede inducir efectos negativos, como la distorsión de la conformación enzimática, impedimentos estéricos o incluso la desnaturalización del biocatalizador. Asimismo, el estudio del efecto del tiempo sobre la inmovilización mostró un incremento en el rendimiento a medida que aumentaba el tiempo de incubación, hasta alcanzar un punto óptimo.

La caracterización de los biocatalizadores inmovilizados obtenidos fue fundamental para comprender el comportamiento catalítico de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en su forma inmovilizada, compararlo con sus versiones libres y evaluar su potencial en aplicaciones industriales. Los resultados mostraron que los mayores rendimientos en la hidrólisis de caseína se alcanzaron a 65-70°C y pH 8 para *Alcalase*®, y a 50-55°C y pH 7-7,5 para *Flavourzyme*®. Se registraron valores de actividad relativa superiores a temperaturas por encima del óptimo en comparación con las enzimas libres, lo cual podría atribuirse a un efecto de estabilización estructural inducido por la inmovilización. En contraste, a temperaturas inferiores al óptimo, las actividades de las enzimas inmovilizadas fueron menores, probablemente debido a impedimentos estéricos en los sitios activos ocasionados por el proceso de inmovilización. La estabilidad térmica de los biocatalizadores fue destacable en los rangos de 60-70°C para *Alcalase*® y 35-45°C para *Flavourzyme*®, observándose una mejora significativa en la estabilidad de *Alcalase*® en comparación con su versión libre, mientras que en el caso de *Flavourzyme*® dicha mejora se presentó únicamente a 50°C. En cuanto a la estabilidad frente al pH, se observó un comportamiento favorable en los rangos de pH 6-9 para *Alcalase*® y 6,5-7,5 para *Flavourzyme*®; sin embargo, el efecto de la inmovilización sobre esta propiedad no fue uniforme al compararlo con las versiones libres. Los estudios cinéticos indicaron una posible inhibición por producto, evidenciada por el incremento del parámetro  $K_m$ . Por su parte, los ensayos de estabilidad operativa mostraron una disminución progresiva de la actividad catalítica tras ciclos consecutivos de

hidrólisis, siendo *Alcalase*® más estable que *Flavourzyme*®. Finalmente, los estudios de estabilidad durante el almacenamiento indicaron una pérdida de actividad en ambos biocatalizadores, aunque *Alcalase*® mantuvo valores residuales superiores a los de *Flavourzyme*®, demostrando un comportamiento más estable.

Los biocatalizadores inmovilizados sintetizados fueron empleados en la hidrólisis del subproducto industrial objetivo (concentrado de proteínas de suero lácteo) con el fin de evaluar su desempeño en condiciones de escalado y obtener hidrolizados con potencial aplicación en el desarrollo de ingredientes bioactivos. Para ello, se aplicaron las condiciones experimentales más recientes y optimizadas por el grupo de investigación, lo que implicó la producción de dos tipos de hidrolizados: uno obtenido exclusivamente mediante la acción de *Alcalase*® y otro generado mediante hidrólisis secuencial utilizando ambas enzimas. Los resultados evidenciaron una reducción en la actividad enzimática tras la inmovilización, dado que fue necesario utilizar mayores cantidades de biocatalizador para alcanzar los grados de hidrólisis deseados (obtenidos con las enzimas en estado libre). Estos estudios no solo comprendieron la hidrólisis de las proteínas del suero, sino también la caracterización de los hidrolizados obtenidos. Esta caracterización reveló modificaciones estructurales y mejoras en propiedades funcionales del sustrato industrial, como un aumento en la estabilidad térmica, solubilidad, humectabilidad y actividad antioxidante, así como una disminución en la hidrofobicidad superficial. En la mayoría de los casos, los resultados fueron similares a los obtenidos con las enzimas en estado libre. Por su parte, el incremento en el grado de hidrólisis (del 15 al 19%) produjo cambios estructurales y variaciones en el perfil peptídico, que impactaron en algunas propiedades evaluadas, tales como el contenido de humedad, la hidrofobicidad superficial, el rendimiento del proceso de secado y las propiedades antioxidantes. Adicionalmente, se analizaron dos variables más: el efecto del tratamiento térmico posterior a la hidrólisis y el método de secado empleado. En términos generales, el tratamiento térmico post-hidrólisis no tuvo efectos significativos sobre las propiedades estudiadas. En cambio, el método de secado resultó ser un factor determinante: la liofilización presentó resultados más favorables en cuanto a las propiedades funcionales, por lo que, aunque el secado por aspersion resulta más viable a nivel industrial, la liofilización podría ser preferible cuando se requieran características funcionales específicas.

**ABSTRACT**

In a country with a consolidated dairy industry and strong cheese production, the utilization of whey, an industrial byproduct, represents a key research direction from an environmental perspective. This byproduct is not only nutritionally valuable but has also demonstrated outstanding techno-functional and biological properties, which are of great interest both for improving human health and for enriching the quality of food products. In this context, the study of insolubilized biocatalysts is fundamental to promoting the sustainable and large-scale production of compounds with nutritional and functional value.

To this end, it is crucial to perform an initial characterization of the biocatalysts in their free form and to evaluate their hydrolytic performance before any immobilization process. In this regard, biochemical, functional, and kinetic studies were carried out on two enzymes: *Alcalase*® and *Flavourzyme*®. During this characterization, which used casein as a substrate, it was observed that the best hydrolysis yields were achieved at 65-70°C and pH 8,5-9,5 for *Alcalase*®, and at 50°C and pH 7,5 for *Flavourzyme*®. The thermal stabilities of both enzymes were notable in the ranges of 50-65°C for *Alcalase*® and 40-45°C for *Flavourzyme*®, while their pH stabilities were greater in the range of pH 6-8,5 for *Alcalase*® and at pH 6,5 and 8 for *Flavourzyme*®. Furthermore, the increase in the  $K_{0,5}$  suggested possible product inhibition. In long-duration hydrolytic processes, it was evidenced that increasing temperature, time, and pH (up to optimal values) favored catalytic activity. For its part, the study of the effect of metal ions on enzymatic activity underscored the importance of evaluating each ion and its concentration specifically.

Due to the greater capacity for cleaving peptide bonds demonstrated by *Alcalase*® compared to *Flavourzyme*®, and considering their distinct catalytic activities, the decision was made to use only free *Alcalase*® for hydrolytic studies with the industrial byproduct: whey protein concentrate. This biocatalyst allowed for obtaining two hydrolysates with high degrees of hydrolysis (22,1 and 29,1%), which exhibited antioxidant and antihypertensive effects significantly superior to the controls, although they did not show relevant antimicrobial effects. The studies not only included the analysis of the bioactivities of the obtained hydrolysates but also involved fractionations using chromatographic techniques. These methods contributed to the understanding of the hydrolysates, thus complementing the research group's previous knowledge. The observed antioxidant effects were associated with the presence of negatively charged residues and aliphatic hydrophobic residues, while the antihypertensive properties showed a greater relationship with charged and aromatic hydrophobic residues. Additionally, the evaluated bioactivities were associated with low molecular weight compounds (<1 kDa).

During the biocatalyst immobilization process, various techniques, activating agent concentrations, and the influence of incubation time on immobilization yields were evaluated.

The studies revealed low yields when using methods based on adsorption to chitosan or cross-linking, in contrast to the good results obtained through covalent immobilization between chitosan and the enzymes, using glutaraldehyde as the activating agent. The use of different glutaraldehyde concentrations showed that low concentrations result in lower yields, due to the scarce availability of functional groups capable of reacting with the specific groups of the enzymes, which favors the leaching or loss of the enzymatic molecules. In contrast, higher concentrations allow for a greater number of bonds between the biocatalyst and the support, reducing enzyme leakage. However, an excess of the activating agent can also induce negative effects, such as the distortion of the enzymatic conformation, steric hindrance, or even the denaturation of the biocatalyst. Likewise, the study of the effect of time on immobilization showed an increase in yield as the incubation time increased, until an optimal point was reached.

The characterization of the obtained immobilized biocatalysts was fundamental to understanding the catalytic behavior of *Alcalase*® and *Flavourzyme*® in their immobilized form, comparing it with their free versions, and evaluating their potential in industrial applications. The results showed that the highest yields in casein hydrolysis were reached at 65-70°C and pH 8 for *Alcalase*®, and at 50-55°C and pH 7-7,5 for *Flavourzyme*®. Higher relative activity values were recorded at temperatures above the optimum compared to the free enzymes, which could be attributed to a structural stabilization effect induced by immobilization. In contrast, at temperatures below the optimum, the activities of the immobilized enzymes were lower, likely due to steric hindrance at the active sites caused by the immobilization process. The thermal stability of the biocatalysts was notable in the ranges of 60-70°C for *Alcalase*® and 35-45°C for *Flavourzyme*®, observing a significant improvement in the stability of *Alcalase*® compared to its free version, while in the case of *Flavourzyme*® this improvement was only present at 50°C. Regarding pH stability, favorable behavior was observed in the pH 6-9 ranges for *Alcalase*® and 6,5-7,5 for *Flavourzyme*®; however, the effect of immobilization on this property was not uniform when compared to the free versions. Kinetic studies indicated possible product inhibition, evidenced by the increase of the  $K_m$  parameter. For their part, the operational stability tests showed a progressive decrease in catalytic activity after consecutive hydrolysis cycles, with *Alcalase*® being more stable than *Flavourzyme*®. Finally, the storage stability studies indicated a loss of activity in both biocatalysts, although *Alcalase*® maintained higher residual activity than *Flavourzyme*®, demonstrating more stable behavior.

The synthesized immobilized biocatalysts were used in the hydrolysis of the target industrial byproduct (whey protein concentrate) in order to evaluate their performance under scaling conditions and obtain hydrolysates with potential application in the development of bioactive ingredients. For this, the most recent and optimized experimental conditions by the research group were applied, which involved the production of two types of hydrolysates: one

obtained exclusively through the action of *Alcalase*® and another generated through sequential hydrolysis using both enzymes. The results evidenced a reduction in enzymatic activity after immobilization, given that it was necessary to use greater amounts of biocatalyst to achieve the desired degrees of hydrolysis (obtained with the free enzymes). These studies not only encompassed the hydrolysis of whey proteins but also the characterization of the obtained hydrolysates. This characterization revealed structural modifications and improvements in functional properties of the industrial substrate, such as an increase in thermal stability, solubility, wettability and antioxidant activity, as well as a decrease in surface hydrophobicity. In most cases, the results were similar to those obtained with the free enzymes. Furthermore, the increase in the degree of hydrolysis (from 15 to 19%) produced structural changes and variations in the peptide profile, which impacted some evaluated properties, such as moisture content, surface hydrophobicity, drying process yield, and antioxidant properties. Additionally, two more variables were analyzed: the effect of the thermal treatment post-hydrolysis and the drying method employed. In general terms, the post-hydrolysis thermal treatment did not have significant effects on the studied properties. In contrast, the drying method proved to be a determining factor: freeze-drying presented more favorable results in terms of functional properties, so, although spray-drying is more viable at an industrial level, freeze-drying could be preferable when specific functional characteristics are required.

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Industria láctea y producción de suero**

La industria láctea es una parte fundamental del desarrollo productivo de Argentina, así como de la provincia de Santa Fe (Dalla Costa, 2015). En el país se producen más de 10 mil millones de litros de leche al año. De esta cantidad, casi la mitad se destina a la elaboración de quesos, aproximadamente un 30% a la producción de leche en polvo y alrededor del 20% a la obtención de leche fluida. Los porcentajes restantes se distribuyen en la producción de yogures (4,4%), dulce de leche (2,2%) y otros usos (0,3%) (Ventimiglia et al., 2021).

Durante la elaboración de quesos, la caseína de la leche se precipita generando aproximadamente 9 L de suero lácteo por cada 10 L de leche procesada, lo que representa un volumen significativo. Este subproducto líquido es nutricionalmente importante, ya que conserva alrededor del 55% de los nutrientes presentes en la leche. Su composición depende de múltiples factores, tales como la fuente de la leche, la etapa de lactancia y el tipo de alimentación del mamífero, el método de elaboración del queso, entre otros. Dentro de sus nutrientes, se encuentran la lactosa, las proteínas solubles, los lípidos, las sales minerales y las vitaminas (Colmenares et al., 2023).

La lactosa se presenta en una proporción de 4,5-5% (m/v) y es fundamental para la producción de ácido láctico y compuestos aromáticos por acción de microorganismos, así como para procesos de fermentación específicos (producción de etanol, exopolisacáridos, ácido propiónico, etc.). Tras la hidrólisis de este disacárido en galactosa y glucosa, el suero se convierte en un medio alternativo para el cultivo de microorganismos tanto nativos como recombinantes. En cuanto a los lípidos, representan un 0,4-0,5% (m/v) y actúan como un vehículo importante para vitaminas liposolubles. Dentro de los minerales (8-10% de extracto seco) y vitaminas presentes destacan el potasio, el calcio, el fósforo, el sodio, el magnesio, así como las vitaminas del grupo B y el ácido ascórbico. En lo que respecta al perfil proteico, el lactosuero contiene aproximadamente el 20% de las proteínas lácteas, las cuales incluyen  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LA),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LB), albúmina sérica bovina (BSA), proteasas-peptonas e inmunoglobulinas. Si bien las proteínas no constituyen la fracción más abundante del lactosuero [0,6-0,8% (m/v)], son interesantes desde el punto de vista nutricional, biológico y tecnológico (Parra Huertas, 2009; Asas et al., 2021; Giulianetti de Almeida et al., 2023).

Desde el punto de vista nutricional, las proteínas lácteas se destacan por su alto valor biológico, que depende de la presencia de aminoácidos esenciales. Estos aminoácidos son aquellos que el organismo no puede sintetizar por sí mismo y, por lo tanto, deben ser obtenidos a través de la alimentación. La ingesta adecuada de aminoácidos esenciales es crucial para diversas

funciones biológicas, incluyendo la síntesis de proteínas, la regulación del metabolismo y el mantenimiento de la masa muscular. En este contexto, las proteínas del suero lácteo constituyen una fuente importante de estos aminoácidos, contribuyendo así a una nutrición equilibrada y a la salud general del organismo (Cacciutto et al., 2023).

Desde el punto de vista biológico, las proteínas del lactosuero han demostrado poseer efectos anticancerígenos e inmunológicos de relevancia. En esta dirección,  $\alpha$ -LA y  $\beta$ -LB, por ejemplo, se han asociado con un impacto positivo sobre la salud, incluyendo el aumento de la secreción de insulina y el retraso del vaciado gástrico, lo que contribuye a un mejor control glucémico. Por su parte, la lactoferrina no sólo es importante para la absorción del hierro, sino que también exhibe propiedades anticancerígenas, bacteriostáticas, bactericidas e inmunológicas. Además, las proteínas presentes en menor proporción, como los fragmentos de  $\beta$ -caseína, las fosfolipoproteínas, las lactoporinas, la lactoperoxidasa y la lisozima, también poseen efectos biológicos. Estas proteínas, ricas en calcio, poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias que pueden contribuir al bienestar general (Colmenares et al., 2023).

Desde el punto de vista tecnológico, las proteínas de suero lácteo se destacan por sus propiedades funcionales, que incluyen solubilidad, textura y consistencia, así como sus capacidades emulsificantes, gelificantes y formadora de espuma, entre otras. Estas características las convierten en ingredientes valiosos para la formulación y/o mejora de la calidad de productos alimentarios. Por ejemplo, su alta solubilidad las hace especialmente adecuadas para la elaboración de bebidas ácidas y aderezos, mientras que su capacidad para generar espuma es útil en la preparación de postres, helados aireados y merengues (Parra Huertas, 2009).

## **1.2. Aprovechamiento del lactosuero**

El lactosuero se caracteriza por poseer una elevada demanda bioquímica (40-60 g/L) y química (50-80 g/L) de oxígeno, lo que lo vuelve dañino para el ambiente (Ryan & Walsh, 2016). Asimismo, el tratamiento biológico es complicado debido a su habitual pH ácido (3,8-6,5), además del contenido de sodio, potasio, amoníaco libre y ácidos grasos volátiles (Dullius et al., 2018). Por estas razones, el aprovechamiento del suero de quesería es un asunto que requiere atención, más aún, a sabiendas de que la producción de queso y, por ende, de lactosuero, aumentará aproximadamente un 14% para el año 2029 (Giulianetti de Almeida et al., 2023).

En Argentina, la recuperación parcial de nutrientes de alta calidad, principalmente proteínas, se realiza comúnmente mediante procesos combinados de separación-concentración con membranas, evaporación y/o secado spray. De esta forma, algunas industrias han incorporado a sus productos lácteos una variedad de subproductos en polvo como, por ejemplo, suero entero, suero desmineralizado, concentrados y aislados proteicos, caseínas, caseinatos y lactosa (Fenoglio

et al., 2016). Aunque se han estudiado diversas alternativas tecnológicas para la recuperación de compuestos de interés, tales como la obtención de probióticos, metano, hidrógeno, biopolímeros, entre otros, una cantidad considerable de lactosuero permanece sin utilizar, representando más del 50% del total (Yadav et al., 2015). Esto resalta la necesidad de desarrollar nuevas e innovadoras estrategias de recuperación del lactosuero, de manera tal de reducir los problemas de contaminación ambiental ocasionados por su vertido indiscriminado en sistemas acuáticos (Fernández Rodríguez et al., 2016).

### **1.3. Péptidos bioactivos**

En la actualidad, se ha incrementado el interés por la obtención de fragmentos bioactivos de proteína a partir de fuentes alimentarias, conocidos como péptidos bioactivos (Chalamaiah et al., 2019). Se trata de compuestos formados por 2 a 20 residuos de aminoácidos que, como su nombre lo indica, presentan propiedades beneficiosas para la salud. Dichas propiedades dependen de la composición y secuencia de aminoácidos, de su longitud y carga, y se hacen presentes cuando los péptidos son liberados de la matriz proteica que los contiene (Sah et al., 2018; Chalamaiah et al., 2019).

#### ***1.3.1. Fuente de péptidos bioactivos***

Diversas son las matrices proteicas alimentarias estudiadas que contienen péptidos bioactivos en estado latente. Entre las de origen animal, se encuentran el huevo (Song et al., 2024), las carnes y sus subproductos (Andiana et al., 2023; López-Pedrouso et al., 2023), los desechos de la industria pesquera (Ramakrishnan et al., 2023) y la leche (Nielsen et al., 2023). Dentro de las fuentes de origen vegetal es posible mencionar los cereales como el arroz, el trigo, el amaranto y la quinoa; las legumbres como porotos, arvejas, garbanzos, lentejas; las semillas oleaginosas como la soja, canola, girasol, maní; así como las frutas y verduras (Anon et al., 2023). Otras fuentes interesantes de péptidos bioactivos las constituyen las algas (Leong & Chang, 2024), los hongos (Li et al., 2023) y los insectos comestibles (Teixeira et al., 2023).

Entre estas fuentes proteicas, el lactosuero se destaca por su alta calidad nutricional, contando con un puntaje de aminoácidos corregido por la digestibilidad de proteínas de 1 (puntaje más alto posible), y un valor biológico mayor que la propia caseína de la leche (Dullius et al., 2018). Se han evaluado diversas bioactividades en péptidos obtenidos a partir del suero lácteo, tales como actividad antihipertensiva, antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, anticancerígena, inmunomoduladora, opioide, entre otras (Nielsen et al., 2023; Pillai et al., 2024). Además, se han reportado propiedades tecnofuncionales importantes para la industria, como la capacidad emulsionante, espumante, gelificante, etc. (Zaky et al., 2022; Abd El-Salam & El-Shibiny, 2017).

La combinación de atributos biológicos y tecnofuncionales presentes en los péptidos bioactivos los convierte en interesantes aditivos alimentarios, ya que no sólo resultan beneficiosos para la salud, sino que también pueden contribuir a la mejora de la calidad de un producto (Mahgoub et al., 2023). Otras áreas de implementación de péptidos bioactivos involucran la cosmética, la industria farmacéutica y la alimentación de animales (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2017).

### ***1.3.2. Obtención de péptidos bioactivos***

Como se mencionó anteriormente, para que estos fragmentos proteicos presenten propiedades bioactivas deben ser liberados de la matriz proteica que los contiene. Su liberación se puede llevar a cabo a través de distintos mecanismos, ya sea mediante hidrólisis ácida, alcalina, enzimática, gastrointestinal, por fermentación microbiana, ingeniería genética, entre otras.

Las hidrólisis ácida y alcalina son métodos tradicionales que con el tiempo han perdido interés, ya que reducen la calidad nutricional del sustrato. La hidrólisis ácida ocasiona cambios estructurales y químicos en los péptidos y aminoácidos liberados durante la reacción, mientras que, la hidrólisis alcalina destruye las proteínas generando sustancias tóxicas (Guadix et al., 2000).

La fermentación microbiana es uno de los métodos de obtención de péptidos bioactivos que se basa en la hidrólisis mediada por una matriz compleja de enzimas, liberadas por microorganismos en condiciones específicas. Aunque es un método relativamente económico, el rendimiento de péptidos y la especificidad en la producción son bajos. Otra técnica es la síntesis química, es decir, la preparación de péptidos bioactivos teniendo en cuenta secuencias de aminoácidos conocidas. La síntesis puede llevarse a cabo en fase líquida o en fase sólida. Se caracteriza por ser un método sencillo, práctico, efectivo y automatizado. Sin embargo, previo a la síntesis es necesario conocer la secuencia de aminoácidos del péptido en cuestión. Para ello, se combinan técnicas de digestión enzimática y técnicas de síntesis química. Aun así, su alto costo limita su aplicación a escala de laboratorio (Song et al., 2024).

La hidrólisis mediada por enzimas es el método comúnmente utilizado para la obtención de péptidos bioactivos, ya que permite un mejor control de las condiciones del proceso, no se adicionan sustancias extrañas y se conserva el valor nutritivo del sustrato. Sumado a esto, los costos del proceso y de energía se reducen gracias a la elevada especificidad y a la gran actividad catalítica que presentan las enzimas, las cuales permiten el uso de condiciones suaves de hidrólisis. Estos catalizadores biológicos provienen de fuentes microbianas, fúngicas o vegetales, siendo las enzimas comerciales de grado alimentario las comúnmente utilizadas (Guadix et al., 2000; Cruz-Casas et al., 2021).

### **1.3.3. Caracterización y purificación de péptidos bioactivos**

Los péptidos bioactivos presentes en matrices alimentarias tienen la particularidad de estar en concentraciones muy bajas. Por ello, su aislamiento para caracterización o purificación, debe hacerse mediante técnicas analíticas altamente sensibles, pero adecuadamente robustas y fiables. Las mismas deben permitir la detección de la mayor cantidad de péptidos posible y, a su vez, facilitar la eliminación de compuestos abundantes no deseados como proteínas o lípidos (Purohit et al., 2024).

Las tecnologías de caracterización y/o purificación disponibles abarcan desde la separación por membranas, que incluye la diálisis, microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa, hasta la tecnología cromatográfica, ya sea de intercambio iónico, de filtración en gel, de afinidad y líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) (Wen et al., 2023). Las primeras se basan en el uso de membranas como barreras selectivas y permiten separar macropéptidos y proteínas no hidrolizadas (usando membranas de 1 a 10 kDa), así como concentrar péptidos más pequeños (<1 kDa), todo ello en condiciones suaves y sin reacciones químicas (Wang et al., 2017; Alavi & Ciftci, 2023; Ahmed et al., 2024). Por otro lado, las técnicas cromatográficas permiten separar y caracterizar péptidos según su afinidad relativa hacia las fases estacionaria y móvil, fraccionándolos de esta forma según su peso molecular, carga, hidrofobicidad y unión reversible de los compuestos a un ligando específico, dependiendo del tipo de técnica (Wang et al., 2017; Alavi & Ciftci, 2023).

## **1.4. Enzimas**

Las enzimas, también conocidas como catalizadores biológicos o biocatalizadores, son proteínas que catalizan reacciones químicas. Constituyen una de las alternativas tecnológicas más útiles dentro de los principios de la química verde y el desarrollo sostenible, los cuales se basan principalmente en la prevención de la contaminación, más que en la remediación de residuos (Sheldon & Woodley, 2018; Rafiee & Rezaee, 2021).

Las enzimas caracterizadas hasta la actualidad derivan de recursos renovables, siendo los hongos su principal fuente (representando más del 50% del total producido). En menor medida, se obtienen de bacterias (>30%), animales (8%) y plantas (4%) (Rafiee & Rezaee, 2021). Estos catalizadores se extraen en forma soluble, eliminando los restos celulares que las producen. De esta forma, se evitan problemas de difusión de sustrato que pueden surgir al utilizar células enteras para las catálisis. Aunque las enzimas generalmente no suelen someterse a procesos de purificación extensivos para evitar elevar los costos, la proteína presente en la mezcla no purificada suele contribuir a la estabilidad de las mismas (Sheldon & Woodley, 2018).

En comparación con los catalizadores orgánicos e inorgánicos tradicionales, las enzimas destacan por su fácil disponibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad. Las reacciones enzimáticas se realizan bajo condiciones operativas suaves, en medio acuoso (fundamentalmente), no requieren equipos adicionales (como aquellos de alta presión), y generan menos residuos. Dichas características hacen que la biocatálisis sea una opción atractiva, tanto desde el punto de vista ambiental como económico (Sheldon & Woodley, 2018).

A lo largo de los años, la aplicación industrial de las enzimas ha aumentado significativamente, abarcando desde la producción de alimentos y bebidas hasta la fabricación de productos básicos, como el cuero y el lino (Jemli et al., 2016). En la industria alimentaria, ejemplos de su uso incluyen la coagulación de la leche, el control del volumen y la estructura de la miga del pan, la reducción del amargor en jugos cítricos, y la mejora del sabor de la cerveza, así como la obtención de fibra, entre otros. En otro tipo de industrias, las enzimas se utilizan como ingredientes activos que ayudan a eliminar manchas en detergentes para ropa, se las utiliza para la decoloración y desintoxicación de efluentes de industrias textiles, para la síntesis de intermediarios para la producción de ingredientes farmacéuticos activos, etc. Su versatilidad se extiende a áreas como la síntesis quimioenzimática y la generación de nuevos biocombustibles a partir de biomasa renovable. Además, se emplean como biosensores, en bioingeniería, como agentes terapéuticos y en diagnósticos modernos (Chapman et al., 2018; Rafiee & Rezaee, 2021).

Este panorama refleja cómo las industrias están incorporando cada vez más enzimas en sus procesos, impulsadas por las limitaciones de los métodos fisicoquímicos tradicionales, por las crecientes restricciones legales y preocupaciones ambientales, y por una mayor apuesta a los aportes derivados del avance científico (Ghaffari-Moghaddam et al., 2014).

### ***1.4.1. Proteasas***

Según la Comisión Internacional de Enzimas, las enzimas se dividen en seis grupos principales: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas (Webb, 1993). Entre estos grupos, las hidrolasas destacan como las enzimas más empleadas en biotransformaciones industriales, siendo las proteasas especialmente relevantes debido a su amplia aplicabilidad. Estas enzimas se utilizan en diversas industrias, como la alimentaria, textil, la de detergentes, productos químicos, farmacéutica, así como en la producción de pulpa, papel y cuero (Ghaffari-Moghaddam et al., 2014).

Las proteasas son hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos y, al igual que todas las enzimas, se caracterizan por su selectividad y especificidad. La manera más usual de clasificarlas es como endopeptidasas y exopeptidasas, según la posición en la que actúan. Esta clasificación no sólo permite identificar el sitio de acción de la enzima, sino que también

determina las características de los productos finales: las endopeptidasas generan péptidos más grandes en comparación con las exopeptidasas. Estas últimas se dividen a su vez en dos subtipos: las aminopeptidasas, que liberan productos con uno, dos o tres residuos aminoácidos del extremo N-terminal; y las carboxipeptidasas, que producen aminoácidos libres o dipéptidos del extremo C-terminal. Las endopeptidasas, por su parte, reconocen múltiples sitios de escisión, lo que les confiere una acción amplia en la hidrólisis de enlaces peptídicos. A pesar de su amplia capacidad, estas enzimas pueden ser selectivas en su actividad, reconociendo aminoácidos o secuencias de aminoácidos específicas. Por ejemplo, las cisteín-peptidasas reconocen secuencias específicas y emplean un residuo de cisteína en su sitio activo para realizar el reconocimiento y corte de la secuencia peptídica (Illanes et al., 2012; Tacias-Pascacio et al., 2020).

#### **1.4.1.1. *Alcalase*® y *Flavourzyme*®**

En el presente trabajo, se emplearon dos enzimas comerciales de grado alimentario para la hidrólisis de concentrado de proteínas de suero lácteo. Una de ellas es *Alcalase*®, una serina-endopeptidasa de bajo costo y de acción alcalina, producida por la cepa *Bacillus licheniformis* (Eberhardt et al., 2019). También se la conoce con el nombre de Subtilisina Carlsberg, subtilisina A o subtilopeptidasa A. Sin embargo, desde que la empresa *Novozymes A/S* comenzó a comercializarla lo hizo con el nombre de *Alcalase*®, constituyéndose en su marca registrada. Esta enzima se comercializa como una preparación enzimática líquida compuesta por aproximadamente un 50% (m/m) de glicerol, un 41% (m/m) de agua y un 9% (m/m) de extracto de la proteasa. Además, se le adicionan agentes estabilizantes e iones, usualmente presentes como sales, para mejorar su estabilidad. Al igual que otras proteasas alcalinas, se usó por primera vez como componente en productos de limpieza. Luego, se utilizó como auxiliar en el proceso de desgomado de fibras de seda y en otros procesos textiles. Más tarde, *Alcalase*® se incorporó en la producción y modificación de alimentos, abarcando un amplio campo de aplicación, fundamentalmente en la producción de hidrolizados proteicos (Tacias-Pascacio et al., 2020).

*Novozymes A/S* informa que la actividad óptima de *Alcalase*® se puede presentar a valores de pH cercanos a 10 y su actividad máxima a una temperatura de 70°C (Tacias-Pascacio et al., 2020). Esta enzima se destaca por su baja selectividad y especificidad, siendo capaz de hidrolizar una amplia variedad de sustratos proteicos, con una preferencia hacia la mayoría de los enlaces peptídicos que contienen residuos aromáticos y ácidos junto a residuos hidrofóbicos (Tavano, 2013). En comparación con otras enzimas, como papaína, tripsina o quimotripsina, *Alcalase*® demostró una capacidad de hidrólisis significativamente superior al trabajar con concentrado de proteína de salvado de arroz y proteína de soja, llegando a ser diez veces mayor que las demás enzimas analizadas. Además, se ha reportado en la literatura el uso exitoso de

*Alcalase*® para la obtención de péptidos bioactivos a partir de diversas fuentes proteicas, tanto de origen vegetal como animal (Tacias-Pascacio et al., 2020).

La hidrólisis proteica mediada por *Alcalase*® produce péptidos relativamente cortos y resistentes a las enzimas digestivas (Sah et al., 2018), con propiedades antioxidantes superiores a los péptidos generados con otras enzimas (Zhang et al., 2013). No sólo se ha informado la obtención de péptidos antioxidantes a partir de la hidrólisis de matrices proteicas con *Alcalase*®, sino también péptidos con diversas propiedades, como actividad anticancerígena, antidiabética, antihipertensiva, antimicrobiana e inmunomoduladora, entre otras. Esta enzima, ya sea sola o en combinación con otras, es capaz de liberar péptidos con múltiples bioactividades. Diversos estudios han evidenciado dos o más bioactividades en un mismo hidrolizado, lo cual puede asociarse a dos factores. Por un lado, a la amplia especificidad de *Alcalase*® que rompe numerosos enlaces peptídicos y genera una gran cantidad de péptidos diferentes; y, por otro lado, a la naturaleza de los hidrolizados que, como mezcla de péptidos, confiere multifuncionalidad al producto de hidrólisis (Tacias-Pascacio et al., 2020).

La segunda enzima empleada fue *Flavourzyme*®, una proteasa fúngica obtenida a partir de la fermentación de una cepa específica de *Aspergillus oryzae*, comercializada inicialmente por *Novo Nordisk A/S* y, en la actualidad, por *Novozymes A/S*. Esta enzima está compuesta por una mezcla de exo- y endopeptidasas, además de sales y agentes estabilizantes (Hansupalak et al., 2010; del Mar Yust et al., 2013). Como su nombre lo indica, se ha empleado ampliamente para incrementar el desarrollo de sabores y aromas y, simultáneamente, para obtener diversos compuestos bioactivos (Merz et al., 2015b).

En la bibliografía se han informado como condiciones óptimas para el funcionamiento de *Flavourzyme*® un rango de pH entre 5 y 7 y una temperatura de 50°C. Por lo tanto, se utiliza para la hidrólisis de proteínas en condiciones neutras o ligeramente ácidas (Yust et al., 2007). Estudios realizados por Merz et al. (2015b) sobre la preparación comercial de *Flavourzyme*® han identificado ocho enzimas, dos aminopeptidasas, dos dipeptidil peptidasas, tres endopeptidasas y una  $\alpha$ -amilasa. A través de una caracterización bioquímica exhaustiva, los autores informaron los tamaños moleculares y las condiciones óptimas de temperatura y pH para cada una de ellas.

La aplicación de *Flavourzyme*® en la producción de hidrolizados proteicos ha permitido obtener productos con propiedades bioactivas y tecnofuncionales (Yust et al., 2007). Al igual que con *Alcalase*®, las investigaciones abarcan fuentes proteicas tanto de origen vegetal como de origen animal. Se ha reportado que la hidrólisis de proteínas alimentarias con *Flavourzyme*® produce péptidos con actividad antioxidante y antihipertensiva y con mejores propiedades emulsionantes y espumantes (Merz et al., 2015b).

#### **1.4.2. Caracterización de enzimas**

El creciente interés industrial en catalizadores biológicos destaca la necesidad de comprender a fondo su funcionamiento. Por ello, es esencial caracterizar las enzimas en cuanto a sus condiciones óptimas de reacción, termoestabilidad, estabilidad frente al pH, estereoselectividad, entre otros atributos que determinan una catálisis eficiente y rentable (Thapa et al., 2019). Una mayor estabilidad ante diversas condiciones indica que las enzimas conservan su actividad y especificidad, ampliando su aplicabilidad biotecnológica. Por ejemplo, la resistencia a altas temperaturas mejora la solubilidad del sustrato, reduce la contaminación microbiana y acelera las reacciones, lo cual es clave para acortar tiempos en procesos industriales (Bommarius & Paye, 2013).

Así, un estudio detallado de las enzimas con fines aplicados resulta esencial para aprovechar su potencial biotecnológico y evaluar mejoras mediante técnicas como evolución dirigida, ingeniería de proteínas e inmovilización (Bommarius & Paye, 2013; Thapa et al., 2019).

#### **1.5. Inmovilización**

Si bien las enzimas ofrecen ventajas que las convierte en biocatalizadores sostenibles e interesantes a nivel industrial, su sensibilidad a altas temperaturas y cambios de pH limita su aplicación (Memon et al., 2019). Además, al ser solubles en agua, es necesario inactivarlas una vez que se han alcanzado las características deseadas, lo que impide su reutilización. Dado el auge de la tecnología de química verde y el creciente interés de las industrias en las reacciones catalizadas por enzimas, es fundamental seguir trabajando en la producción de biocatalizadores robustos y estables, que faciliten su implementación en procesos industriales (Ghaffari-Moghaddam et al., 2014; Chapman et al., 2018).

Dentro de las estrategias tendientes a mejorar las propiedades bioquímicas de enzimas consideradas interesantes desde el punto de vista industrial, se encuentra la inmovilización. Este término se refiere al confinamiento de células, organismos, organelas, enzimas u otras sustancias o compuestos en una región definida del espacio. Su objetivo es mantener y/o mejorar las propiedades biológicas de estos componentes para que puedan ser utilizados en la producción de un producto determinado, no sólo en un ciclo, sino en múltiples ciclos (Arroyo, 1998; Guisan, 2013; Meneau Hernández et al., 2021). En el contexto enzimático, inmovilizar enzimas en un lugar definido aumenta su estabilidad y permite su reutilización, lo que conlleva una significativa reducción en los costos del proceso, además de facilitar el procesamiento de mayores volúmenes de un cierto tipo sustrato, mejorando así la producción de hidrolizados bioactivos (Guisan, 2013; Manzo et al., 2018).

En 1916, Nelson y Griffin fueron los primeros en demostrar que la enzima invertasa absorbida físicamente en carbón retenía completamente su actividad catalítica (Nelson & Griffin, 1916). Más tarde, la aminoacilasa absorbida en DEAE-*Sephadex* se convirtió en la primera enzima inmovilizada utilizada en la industria para la producción de L-metionina (Liese et al., 2000). En los últimos años, se han desarrollado un sinnúmero de protocolos para la inmovilización de enzimas. Sin embargo, pocos han logrado ser simples y efectivos para ser utilizados a nivel industrial. Esto ha conducido a un largo y continuo camino de investigación dentro de la inmovilización enzimática para lograr industrias sostenibles por medio de la implementación de biocatalizadores insolubilizados (Guisan, 2013).

### **1.5.1. Métodos de inmovilización**

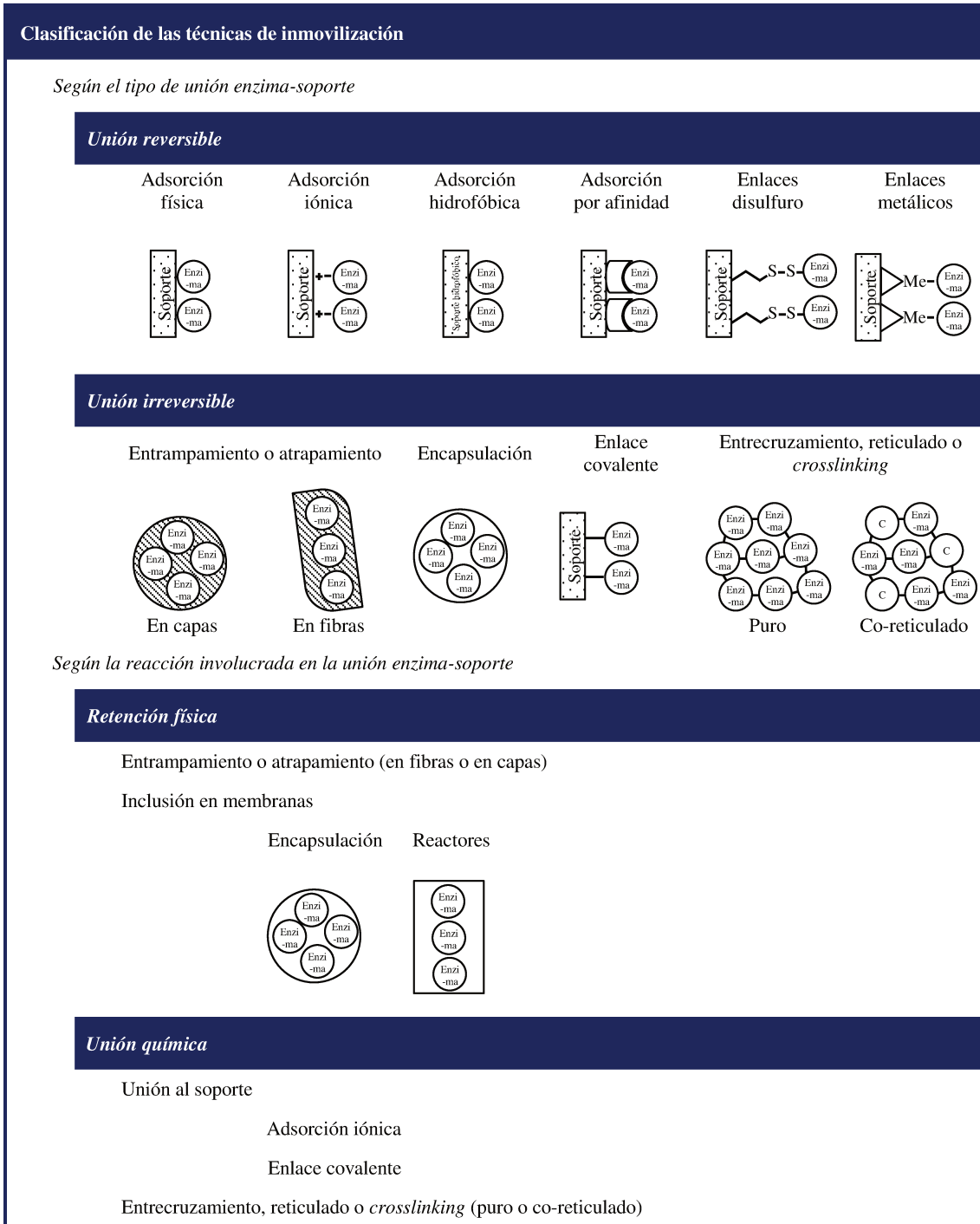
La inmovilización se puede llevar a cabo a través de diversos métodos, que varían desde la absorción física reversible y los enlaces iónicos, hasta los enlaces covalentes estables. Estos métodos se pueden clasificar de diferentes maneras. En la **Figura 1** se presentan dos tipos de clasificaciones: **a)**- según el tipo de unión entre la enzima y el soporte; y **b)**- según el tipo de reacción involucrada en dicha unión.

La clasificación basada en el tipo de unión entre el catalizador y la matriz utilizada como soporte involucra las uniones reversibles y las uniones no reversibles. Dentro de la inmovilización reversible se encuentran la adsorción física, iónica, hidrofóbica o por afinidad, la unión por enlaces disulfuro y la unión metálica. Por su parte, la inmovilización no reversible abarca el entrapamiento, la encapsulación, la unión por enlace covalente y la reticulación (Guisan, 2013; Manzo, 2013; Bashir et al., 2020).

Por otro lado, la clasificación según el tipo de reacción química involucrada en la unión entre la enzima y el soporte comprende los métodos de unión (unión química) y los métodos de entrapamiento (retención física). La inmovilización mediada por uniones químicas puede realizarse mediante la unión a un soporte (como la adsorción iónica o la inmovilización covalente), o por reticulación (que consiste en uniones intermoleculares dentro de la enzima sin la necesidad de un soporte). En cuanto a los métodos de retención física, estos incluyen el entrapamiento en capas o en fibras y la inclusión en membranas por encapsulación o en reactores (Arroyo, 1998; Bashir et al., 2020).

#### **1.5.1.1. Adsorción física**

La inmovilización por adsorción física o no específica es una técnica sencilla basada en la unión de la enzima a un soporte mediante fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Meneau Hernández et al., 2021; Maghraby et al., 2023).



**Figura 1.** Métodos de inmovilización enzimática más expandidos. Imagen modificada de Arroyo (1998), Meneau Hernández et al. (2021) y Maghraby et al. (2023).

El proceso de inmovilización por adsorción implica mantener en contacto el material de soporte con la suspensión enzimática, de forma tal de lograr una interacción directa entre ambos. Este método se caracteriza por ser reversible, de bajo costo y fácil de implementar, además de no generar cambios en la especificidad de la enzima (Arroyo, 1998; Meneau Hernández et al., 2021; Maghraby et al., 2023). Estas ventajas lo convierten en una opción económicamente atractiva. Sin embargo, las uniones entre el soporte y el catalizador generalmente resultan ser débiles,

ocasionando la pérdida del catalizador. Así, factores como la temperatura, el pH o la adición de sustratos no degradables pueden debilitar estas interacciones (Meneau Hernández et al., 2021).

En este contexto, es fundamental la búsqueda de soportes adecuados que cuenten con grupos activos específicos para incrementar las posibilidades de unión, teniendo en cuenta las características de la enzima que se desea inmovilizar. Asimismo, es posible modificar el soporte o la enzima para mejorar la afinidad entre ellos, garantizando así una adsorción exitosa.

El uso de silicatos como matriz soporte ha predominado en la inmovilización por adsorción. Un ejemplo destacado es la adsorción de la enzima lacasa (EC 1.10.3.2) en sílices mesoporosas, que ha demostrado mejorar su estabilidad térmica, su estabilidad frente al pH y su capacidad operativa (Meneau Hernández et al., 2021; Maghraby et al., 2023).

#### *1.5.1.2. Adsorción iónica, hidrofóbica y por afinidad*

La inmovilización por adsorción iónica, hidrofóbica o por afinidad involucra uniones específicas enzima-soporte basadas fundamentalmente, como sus nombres lo indican, en uniones iónicas, hidrofóbicas o de afinidad entre moléculas complementarias, respectivamente. Estos métodos son sencillos y la naturaleza de las uniones es fácilmente reversible mediante cambios de temperatura y de fuerza iónica.

La inmovilización por adsorción iónica se fundamenta en los principios de la cromatografía de intercambio iónico, donde la interacción entre las cargas opuestas de la fase estacionaria (soporte, en este caso) y la fase móvil (la enzima) es clave para su unión. Al implementar esta técnica es importante considerar dos aspectos clave. En primer lugar, aunque es un método simple y reversible, puede resultar complicado encontrar condiciones que permitan que la enzima permanezca fuertemente unida al soporte y completamente activa. En segundo lugar, las propiedades de la enzima, como su pH óptimo o su rango de estabilidad frente al pH, pueden resultar alteradas. Estos cambios pueden representar un problema, aunque también serían útiles si se busca modificar las condiciones óptimas de la enzima hacia un entorno más alcalino o ácido, dependiendo de la aplicación (Guisan, 2013). Estas alteraciones se deben a que la presencia de un soporte cargado puede distorsionar la estructura de la enzima y afectar su cinética, ya que cargas excesivas pueden deteriorar la catálisis enzimática, dificultando así el logro de un alto rendimiento (Maghraby et al., 2023).

Por su parte, la inmovilización por adsorción hidrofóbica no involucra enlaces químicos sino una interacción impulsada entrópicamente. Este tipo de inmovilización también deriva de principios cromatográficos y es fundamental tener en cuenta las variables experimentales como el pH, la concentración de sal y la temperatura. La fuerza de interacción depende tanto de la

hidrofobicidad del soporte como del catalizador, del grado de sustitución del soporte y/o del tamaño de la molécula de ligando hidrofóbico (Guisan, 2013).

Finalmente, la inmovilización por afinidad se basa en el principio de afinidad molecular, que describe la capacidad de dos biomoléculas de unirse de manera específica gracias a la complementariedad química y estructural. Este tipo de interacción puede observarse, por ejemplo, entre una enzima y su ligando, como un anticuerpo, una proteína receptora o un sustrato modificado. La selectividad de la interacción es una de las principales ventajas de esta técnica; sin embargo, el elevado costo del ligando de afinidad limita su aplicación (Guisan, 2013).

### 1.5.1.3. Enlaces disulfuro y enlaces metálicos

La inmovilización mediada por enlaces disulfuro se caracteriza por involucrar enlaces covalentes estables entre soporte y catalizador. Sin embargo, estos enlaces pueden romperse mediante el agregado de un agente específico, ofreciendo a esta técnica la particularidad de poder reutilizar el soporte o recargarlo cuando la enzima se desnaturaliza más rápidamente que el soporte mismo. Este aspecto resulta de gran importancia en aquellos casos en que el uso de enzimas inmovilizadas en procesos industriales se ve limitado por el alto costo del soporte (Guisan, 2013; Zucca & Sanjust, 2014).

Las enzimas que presentan grupos tiol no esenciales en su superficie son especialmente adecuadas para este tipo de inmovilización. Sin embargo, también es posible inmovilizar a través de enlaces disulfuro, enzimas con grupos tiol enmascarados o no reactivos, así como aquellas enzimas que carecen de grupos tiol pero pueden ser modificadas químicamente o mediante ingeniería genética. Las condiciones de inmovilización suelen ser suaves (baja fuerza iónica, pH neutro o ligeramente alcalino, temperatura ambiente) y la reactividad de los grupos tiol puede ser modulada ajustando el pH, lo que a menudo resulta en un alto rendimiento de inmovilización (Guisan, 2013).

Por su parte, la inmovilización mediada por enlaces metálicos involucra el uso de sales o hidróxidos de metales de transición. Se basa en la unión de los mismos a los soportes por coordinación con grupos nucleofílicos presentes. Estos soportes quelados con metales se conocen como adsorbentes IMAC (por sus siglas en inglés: *Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography*) y se han utilizado ampliamente en cromatografía de proteínas (Guisan, 2013).

Al igual que las técnicas anteriores, la inmovilización por enlaces metálicos es reversible y relativamente simple; sin embargo, las estabilidades alcanzadas pueden ser variables y los resultados no siempre son reproducibles. Esto se puede asociar a la presencia de sitios de adsorción no uniformes y/o a la fuga importante de iones metálicos. Una posible solución a este problema es el empleo de enlaces covalentes entre ligandos metálicos y el soporte.

La reversibilidad de este método puede lograrse mediante una reducción del pH o mediante el uso de ligandos solubles que compitan con las proteínas, permitiendo la regeneración del soporte a través de lavados con quelantes fuertes como la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, conocida por sus siglas como EDTA (Nisha et al., 2012; Guisan, 2013).

#### *1.5.1.4. Entrampamiento*

La inmovilización por entrampamiento consiste en retener físicamente a la enzima en una matriz sólida porosa, como geles o fibras. El proceso involucrado es suave, lo que permite que la enzima conserve su estructura. Se puede realizar a través de distintas maneras, por medio de métodos sol-gel, por polimerización, por reticulación de biopolímeros o mediante ensamblaje supramolecular (Imam et al., 2021).

Esta técnica se caracteriza por ser sencilla, requerir pequeñas cantidades de enzima y no ocasionar alteraciones estructurales en la misma. Además, el atrapamiento permite una alta capacidad de carga enzimática, mejora la estabilidad mecánica de la matriz y resulta relativamente económico de implementar. El material utilizado puede adaptarse para optimizar el microambiente enzimático ajustando propiedades como el pH, la polaridad o la anfifilicidad (Robescu & Bavaro, 2025). Sin embargo, esta técnica de inmovilización requiere un control riguroso del proceso y se puede presentar como problemática importante la fuga de la enzima. En tales casos, es crucial evaluar el tamaño de poro de la matriz para permitir únicamente la libre difusión de sustratos y productos (Arroyo, 1998; Maghraby et al., 2023).

#### *1.5.1.5. Encapsulación*

La inmovilización por encapsulación es una técnica relacionada con el entrampamiento, pero a diferencia de este, las enzimas no se encuentran incorporadas en la matriz, sino libres dentro de un espacio controlado que las aísla físicamente sin restringir su movilidad. En este caso, se forman vesículas con membranas porosas semipermeables que permiten la entrada y salida de sustratos o productos e impiden la salida de enzima.


Este método evita el contacto del biocatalizador con el medio circundante, lo que favorece su estabilidad. Sin embargo, presenta como desventaja la aparición de problemas de difusión que pueden provocar una acumulación rápida de productos y, en consecuencia, la ruptura de las membranas semipermeables (Arroyo, 1998; Maghraby et al., 2023).

#### *1.5.1.6. Enlace covalente*

La inmovilización covalente es una técnica fundamentada en la unión de la enzima a un soporte determinado, mediante enlaces fuertes y altamente estables. Generalmente, el soporte se

somete a procesos de activación, en donde se generan grupos electrófilos que reaccionan, durante el proceso de inmovilización, con los grupos nucleofílicos presentes en la enzima.

Diversos compuestos se utilizan como agentes activantes para facilitar la formación de estos enlaces. En la **Figura 2** se nombran algunos de estos compuestos, junto con los grupos funcionales presentes en el soporte y en la enzima, que son necesarios y están involucrados en la interacción entre ambos.

Grupo del soporte	Agente activante	Grupo reactivo de la enzima
	Cloruro de sulfonilo	-NH <sub>2</sub> -SH
-OH	Bisoxiranos (epóxidos) Epiclorhidrina	-NH <sub>2</sub> -SH -OH
-OH -OH; -NH <sub>2</sub> -OH → -CHO	Bromuro de cianógeno Glutaraldehído Glicidol-glioxil	-NH <sub>2</sub>

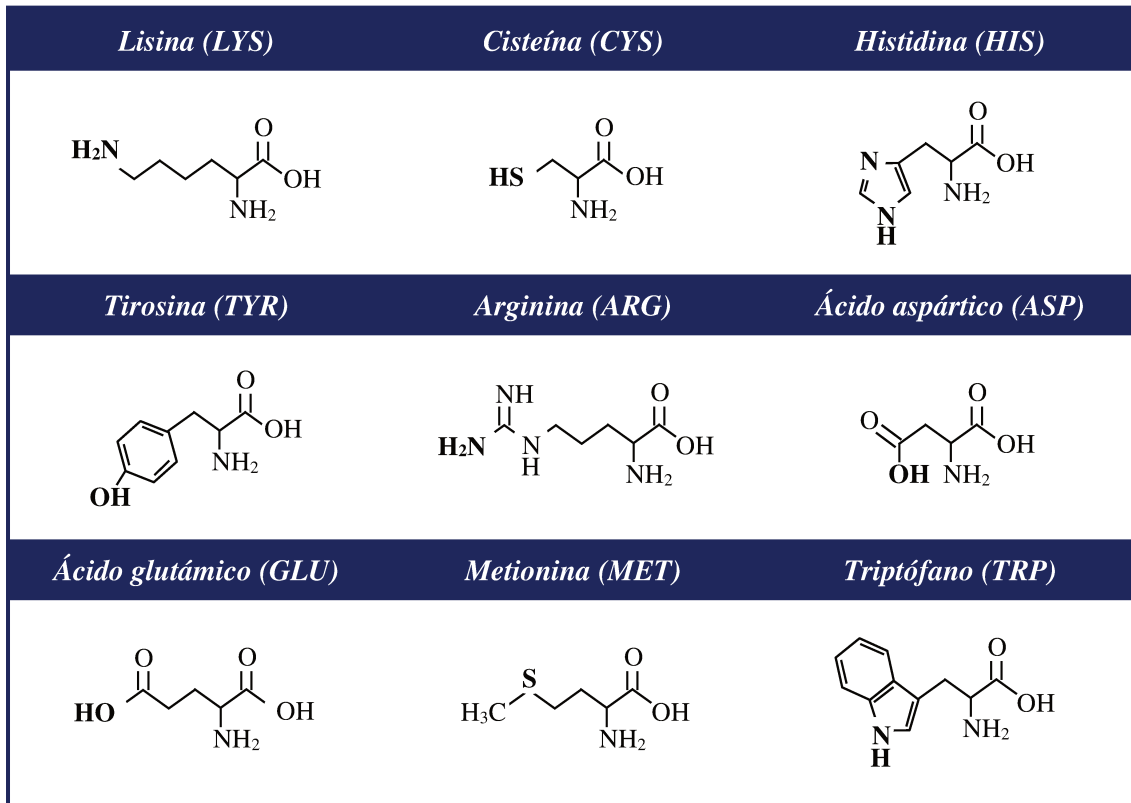
**Figura 2.** Grupos involucrados en la inmovilización covalente y agentes activantes empleados. Imagen modificada de Arroyo (1998), Guisan (2013) y Manzo (2013).

Los residuos aminoacídicos de las enzimas que están implicados en la formación de los enlaces covalentes son principalmente residuos de cisteína, histidina, lisina y tirosina, como así también, pero en menor medida, los residuos de arginina, ácido aspártico y glutámico, metionina y triptófano (**Figura 3**). Entre esos residuos, la lisina constituye uno de los aminoácidos clave donde se enfocan muchas químicas de inmovilización, ya que su presencia facilita la formación de múltiples enlaces covalentes. Esto se debe a su reactividad, abundancia y pK<sub>a</sub> (Luo et al., 2015; Robescu & Bavaro, 2025). El resto de los aminoácidos al no estar expuestos sobre la superficie de la enzima, debido a su carácter hidrofóbico, no pueden intervenir en el proceso de inmovilización.

En este contexto, las reacciones implicadas en la inmovilización covalente son variadas, dependiendo de las características tanto del soporte como de la enzima, así como también del agente que se utilice para modificarlos.

Esta técnica de inmovilización permite producir derivados con una gran estabilidad y una recuperación o reutilización suficiente. No obstante, presenta algunas desventajas, como la necesidad de procedimientos relativamente complejos, largos períodos de incubación para lograr una inmovilización adecuada y posibles restricciones en la movilidad de la enzima, que pueden limitar los cambios conformacionales necesarios para la catálisis. A pesar de estas desventajas, las ventajas de la inmovilización covalente suelen superar los inconvenientes, convirtiéndola en

una de las técnicas más utilizadas e interesantes desde el punto de vista industrial (Arroyo, 1998; Guisan, 2013; Maghraby et al., 2023).



**Figura 3.** Residuos aminoácidos implicados usualmente en la inmovilización covalente.

### 1.5.1.7. Reticulación

La inmovilización por entrecruzamiento, reticulación o *cross-linking* es una técnica que implica la formación de enlaces covalentes intermoleculares en la enzima, por lo que, a diferencia de las técnicas anteriores, no se emplea ningún tipo de soporte (Maghraby et al., 2023). Para ello, se utilizan agentes bifuncionales o multifuncionales que actúan como puentes entre moléculas enzimáticas adyacentes. Entre ellos se encuentran dialdehídos, diiminoésteres, diisocianatos y sales de bisdiazonio (Bashir et al., 2020).

Aunque la técnica es conocida desde la década de 1960, inicialmente pasó desapercibida frente a los biocatalizadores inmovilizados sobre soportes. No obstante, la dilución de la actividad catalítica como consecuencia de la introducción de una gran cantidad de masa no catalítica (90-99%) que resulta en menores rendimientos volumétricos y espacio-temporales y bajas productividades catalíticas, generó un renovado interés por los cristales enzimáticos reticulados, también denominados CLEC (por sus siglas en inglés: *Cross-Linked Enzyme Crystals*). A partir de la década de 1990, los CLEC comenzaron a utilizarse como biocatalizadores industriales, debido a que mostraban una excelente estabilidad operativa, un tamaño de partícula controlable,

alta productividad, fácil recuperación y reutilización (Schoevaart et al., 2004; Sheldon, 2007; Maghraby et al., 2023).

Sin embargo, uno de las principales limitantes de esta técnica es la necesidad de cristalizar la enzima. Este proceso es complejo y requiere una alta pureza enzimática, lo que incrementa considerablemente los costos (Maghraby et al., 2023). Como alternativa a la cristalización, surgió la precipitación enzimática, una técnica de inmovilización que permite obtener agregados enzimáticos reticulados o CLEA (por sus siglas en inglés: *Cross-Linked Enzyme Aggregates*). Esta técnica es más sencilla y económica, ya que no requiere de enzimas altamente puras y combina dos procesos unitarios (purificación e inmovilización) en una sola operación. Además, el uso de compuestos bifuncionales no supone una desventaja, dado que el peso molecular de estos compuestos es insignificante en comparación con el de la enzima, lo que resulta en un biocatalizador inmovilizado compuesto por casi el 100% de proteína enzimática en peso (Schoevaart et al., 2004; Sheldon, 2007).

Aunque la reticulación permite la síntesis de derivados con estabilidades superiores, resistentes a valores extremos de pH y de temperatura gracias a la naturaleza irreversible de los enlaces intermoleculares, puede presentar problemas relacionados con la estabilidad mecánica (Bashir et al., 2020; Maghraby et al., 2023).

### **1.5.2. Soportes**

Al igual que ocurre con las técnicas de inmovilización, existe una amplia variedad de soportes para la obtención de derivados enzimáticos. Estos soportes difieren en el tamaño de la partícula, la naturaleza, la carga de grupos funcionales, la porosidad, entre otras características. En términos generales, se han clasificado según su composición química, en soportes inorgánicos y orgánicos (Guisan, 2013).

#### **1.5.2.1. Soportes inorgánicos**

Los soportes inorgánicos incluyen la sílice y óxidos orgánicos, los minerales y los materiales a base de carbono (Zdarta et al., 2018). Estos soportes se destacan por su excelente resistencia mecánica, térmica y microbiana, y por su porosidad (Zucca & Sanjust, 2014).

En particular, la sílice y los óxidos orgánicos se caracterizan por poseer grupos hidroxilo en su superficie, los cuales permiten modificarlos fácilmente con el fin de favorecer las uniones enzima-soporte. Dentro de ellos, la sílice es la más utilizada, gracias a su alta resistencia térmica y química, sus buenas propiedades mecánicas, su gran área superficial y su estructura porosa.

Por su parte, los minerales (como bentonita, hidroxiapatita, sepiolita, entre otros) y los materiales a base de carbono (como carbonos activados, modificados y no modificados) poseen

una variedad de grupos funcionales en su superficie que facilitan su modificación y permiten la formación de distintos enlaces enzima-soporte (Zucca & Sanjust, 2014; Zdarta et al., 2018).

### 1.5.2.2. Soportes orgánicos

Los soportes orgánicos se subdividen en polímeros sintéticos y polímeros naturales o biopolímeros. Los polímeros orgánicos sintéticos se caracterizan por ofrecer la posibilidad de seleccionar los monómeros en función de la enzima a inmovilizar y el proceso catalítico involucrado. No obstante, se deben tener en cuenta el tipo y la cantidad de monómeros empleados, ya que determinan la estructura química y las propiedades del polímero, es decir, su solubilidad, porosidad, estabilidad y propiedades mecánicas. Estos polímeros presentan una gran variedad de grupos funcionales que, como se mencionó en soportes anteriores, favorecen las interacciones enzima-soporte. Como desventaja es posible mencionar la complejidad y el costo del proceso de síntesis del polímero deseado.

Por su parte, los biopolímeros constituyen una alternativa natural a los polímeros sintéticos. Dentro de este grupo se encuentran la albúmina, la gelatina, el colágeno, la celulosa, las queratinas, la carragenina, la quitina, el quitosano y el alginato, solo por mencionar los más relevantes. Estos polímeros se destacan por ser biodegradables y biocompatibles, por no ser tóxicos y por poseer una gran afinidad por las proteínas. Presentan una amplia disponibilidad de grupos funcionales reactivos en su superficie, que facilita la reacción directa con la enzima, como así también su modificación. Dado que muchos de estos biopolímeros provienen de subproductos industriales, son económicos y contribuyen a reducir los costos del proceso de inmovilización (Zdarta et al., 2018).

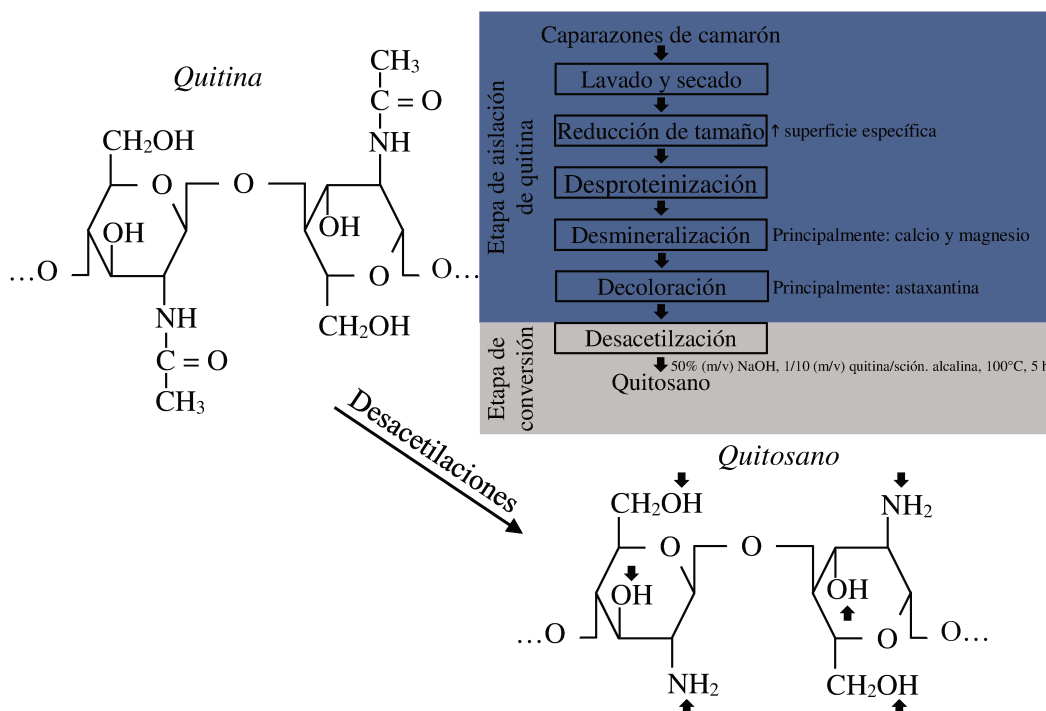
Si bien los soportes inorgánicos presentan múltiples ventajas como, por ejemplo, la alta estabilidad contra la degradación física, química y microbiana, la mayoría de las aplicaciones industriales se llevan a cabo con soportes orgánicos (Guisan, 2013).

Para lograr una inmovilización eficaz de las enzimas, los soportes seleccionados deben cumplir con algunas características: ser química- y térmicamente estables, insolubles en las condiciones de reacción y biocompatibles; poseer grupos reactivos funcionales y una alta afinidad por las enzimas; estar disponibles comercialmente a un precio accesible; y ser capaces de regenerarse y reutilizarse. A su vez, estas características dependen tanto de la enzima a inmovilizar como del proceso catalítico (Zdarta et al., 2018; Maghraby et al., 2023).

Entre los soportes mencionados, en este trabajo se empleó un soporte orgánico, derivado de un polímero natural modificado, para la inmovilización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*®. Dicho soporte es ampliamente utilizado para la inmovilización de enzimas, gracias a su bajo costo y gran disponibilidad, a la ausencia de toxicidad y por ser biocompatible y biodegradable (Manzo

et al., 2018; Antony et al., 2019; Bai & Wu, 2022). Se trata del quitosano, un polisacárido lineal compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina acetilada y D-glucosamina desacetilada, unidas mediante enlaces  $\beta$ -(1-4) distribuidos al azar.

Como se muestra en la **Figura 4**, el quitosano se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, el segundo polímero más abundante de la naturaleza después de la celulosa. Esta se encuentra en las paredes celulares de hongos, en las membranas de insectos y en desechos de la industria pesquera, como el exoesqueleto de crustáceos. La quitina es insoluble en agua y gracias a la remoción de más del 60% de los grupos acetilo, se vuelve, por un lado, soluble a pH ácido debido a la presencia de grupos amino cargados ( $pK_a$  6,5) y, por otro lado, capaz de formar geles en medios alcalinos, como consecuencia de la pérdida de carga en estos grupos.



**Figura 4.** Esquema de la obtención de quitosano a partir de quitina. Imagen modificada de Wang & Zhuang (2022).

Como se aprecia en la **Figura 4**, el quitosano obtenido presenta una alta densidad de grupos amino primarios y grupos hidroxilo, lo que facilita la interacción enzima-soporte por adsorción y, a su vez, permite su modificación (Adriano et al., 2008; Verma et al., 2020; Bai & Wu, 2022).

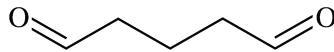
### 1.5.3. Modificación y activación de soportes

Los soportes pueden ser modificados y activados para favorecer las interacciones con las enzimas. La modificación implica la introducción de nuevos grupos funcionales en la matriz del

soporte, capaces de reaccionar de manera covalente con las enzimas. Por su parte, la activación implica volver reactiva a las funciones químicas presentes o introducidas durante la modificación. Estos procesos pueden ocurrir en simultáneo y se llevan a cabo mediante el uso de agentes específicos, tales como haluros orgánicos e inorgánicos, carbodiimidas o agentes bifuncionales, como el glutaraldehído y la epiclorhidrina (Zucca & Sanjust, 2014).

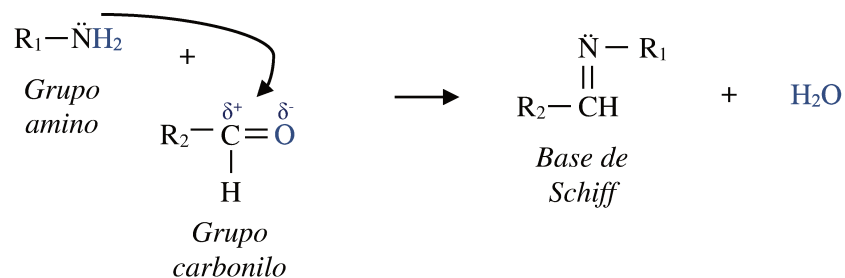
En este estudio, se utilizó glutaraldehído para la modificación y activación del quitosano. Este compuesto es un agente bifuncional comercialmente disponible como solución acuosa al 25% o al 50% en volumen, bastante empleado en la inmovilización por reticulación y por enlace covalente. Este agente bifuncional es frecuentemente elegido debido a su capacidad para reaccionar rápidamente con las aminas primarias y por su versatilidad (Migneault et al., 2004a; Mateo et al., 2007). En comparación con otros aldehídos, el glutaraldehído destaca no sólo por su versatilidad y excelente reactividad sino también por su estabilidad térmica y química y por su bajo costo y fácil disponibilidad comercial (Wahab et al., 2020). Varios trabajos han evidenciado la mejora de la estabilidad y las características catalíticas de proteasas, oxidasas y lipasas a través de la inmovilización mediada por glutaraldehído (Zucca & Sanjust, 2014; Zdarta et al., 2018; Romero-Fernández & Paradisi, 2020).

Como se muestra en la **Figura 5**, el glutaraldehído es un dialdehído que reacciona con grupos funcionales localizados tanto en el soporte como en el catalizador, ya sea amino, tiol o hidroxilo.

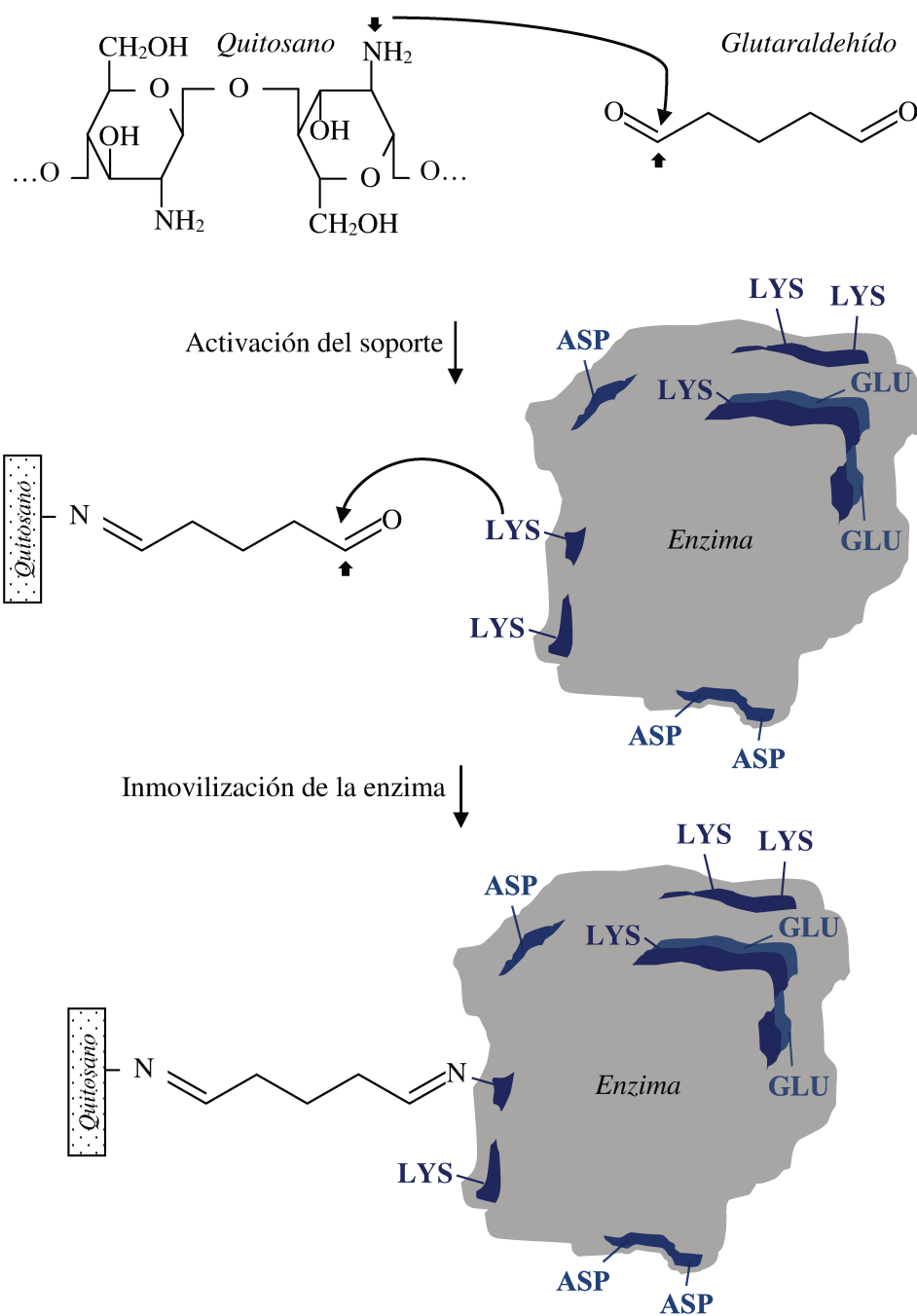


**Figura 5.** Molécula de glutaraldehído.

La reacción entre este compuesto carbonílico y los grupos amino involucra la condensación de Schiff con la consecuente formación de bases de Schiff y la eliminación de moléculas de agua (**Figura 6**) (Adriano et al., 2008; Antony et al., 2019).



**Figura 6.** Formación de la base de Schiff.



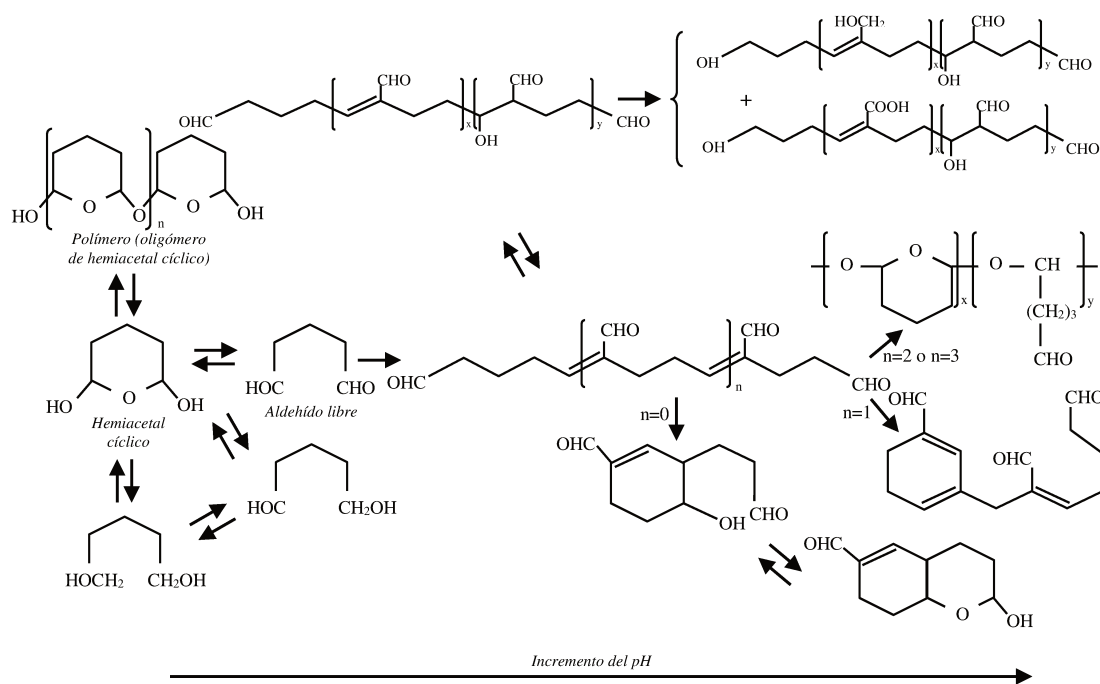
Residuos aminoácidos: **ASP**: ácido aspártico. **GLU**: ácido glutámico. **LYS**: lisina

**Figura 7.** Esquema de inmovilización covalente de enzimas sobre quitosano activado con glutaraldehído.

En el caso del quitosano, el glutaraldehído permite la modificación y activación simultáneas a través de la introducción de grupos aldehído. Estos grupos aldehído son grupos electrofílicos capaces de reaccionar con los grupos nucleofílicos presentes en las enzimas (**Figura 7**). Entre estos grupos nucleofílicos se destacan los grupos amino del extremo N-terminal y de los residuos de lisina, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en las proteínas. Estos grupos amino se caracterizan por su gran reactividad, fundamentalmente a valores de pH entre 6

y 8, en el caso del grupo amino terminal ( $pK_a = 7-8$ ), y a pH alcalinos, en el caso del grupo amino de la lisina ( $pK_a$  cercano a 10). Es importante mencionar que este último grupo se encuentra predominantemente en la superficie de las enzimas, lo que facilita su acceso durante el proceso de inmovilización. Además, dado que no participa en los sitios catalíticos, la unión al soporte mediada por él no afectaría la actividad de las enzimas (Migneault et al., 2004b; Zucca & Sanjust, 2014).

Se ha demostrado que el comportamiento químico del glutaraldehído disponible comercialmente puede variar de manera significativa según el pH del medio. Esto se debe a que puede adoptar diferentes formas estructurales (monómero, dímero, trímero, polímero), lo cual influye directamente en su reactividad y, por ende, en la eficiencia de la inmovilización. En la **Figura 8** se presenta una descripción general de las posibles formas moleculares de este agente activante en solución acuosa, según los estudios realizados en los últimos 40 años (Migneault et al., 2004a).



**Figura 8.** Descripción general de las formas moleculares del glutaraldehído en solución acuosa. Imagen modificada de Migneault et al. (2004a).

El uso de glutaraldehído como agente activante ofrece varias ventajas para la inmovilización de enzimas. Una de ellas es la incorporación de un brazo espaciador relativamente largo entre soporte y proteína, lo que contribuiría a minimizar los problemas de impedimento estérico que comúnmente se presentan durante la inmovilización. Además, cuando se trabaja con glutaraldehído se necesitan de condiciones acuosas suaves y un procedimiento sencillo para que las interacciones soporte-agente activante y soporte activado-enzima ocurran. Sin embargo, es

importante considerar que el glutaraldehído es tóxico, incluso a bajas concentraciones. En este sentido, el 2,5-diformilfurano y la genipina se han propuesto como alternativas a este dialdehído, ya que presentan una menor toxicidad y, en el caso de la genipina, su uso está aprobado en productos alimentarios (Migneault et al., 2004a; Zucca & Sanjust, 2014; Flores et al., 2019; Danielli et al., 2022; Wang & Zhuang, 2022).

#### **1.5.4. Efectos de la inmovilización**

La inmovilización de enzimas, en general, puede tener diversos efectos sobre sus características, especialmente sobre su actividad biológica. Los cambios estructurales en la enzima, junto con las modificaciones en el microambiente enzima-sustrato, pueden afectar su especificidad por el sustrato, su dependencia de la temperatura y el pH, y su estabilidad.

En cuanto a la especificidad del sustrato, se ha reportado que la actividad de la enzima tiende a disminuir, en especial cuando se trata de sustratos con un alto peso molecular. Esto se debe fundamentalmente a la presencia de problemas de difusión. En contraste, para sustratos de bajo peso molecular, la actividad enzimática no se ve afectada significativamente (Khan, 2021). Respecto a la dependencia de la temperatura, se han presentado cambios en la temperatura óptima de reacción hacia valores superiores, luego de la inmovilización. Esto se debe a que la movilidad térmica de la enzima se ve restringida en comparación con la enzima libre, lo que reduce la desnaturalización térmica (Wahab et al., 2020; Khan, 2021).

En cuanto al pH, algunas enzimas mantienen su pH óptimo de catálisis tras la inmovilización, mientras que otras presentan cambios. Estos efectos pueden deberse a la generación de un microambiente diferente al de la solución, que altera las propiedades electrolíticas, hidrofílicas o hidrofóbicas del sistema (Manzo, 2013). En relación a la estabilidad, se han reportado mejoras significativas en comparación con las enzimas libres, lo que representa una ventaja considerable para el uso de enzimas inmovilizadas en procesos industriales. Estos cambios pueden relacionarse a la unión de la enzima al soporte a través de sitios de unión para inhibidores, al aumento de la rigidez de la enzima o a la reducción de su flexibilidad. Estas modificaciones contribuyen a reducir la desnaturalización rápida y los procesos de autólisis (Manzo, 2013; Wahab et al., 2020; Khan, 2021; Rodrigues et al., 2021).

#### **1.6. Escalado de procesos hidrolíticos enzimáticos**

El creciente interés en incorporar péptidos bioactivos como ingredientes en alimentos funcionales debido a las múltiples propiedades que han demostrado, presenta diversos desafíos en la transición de la producción a escala de laboratorio a la producción a escala industrial. Para lograr esta transición eficaz, es necesario considerar una serie de aspectos claves antes, durante y después del proceso hidrolítico (Dullius et al., 2018).

### **1.6.1. Pretratamiento del sustrato**

Las proteínas lácteas suelen someterse a un tratamiento antes del proceso hidrolítico, utilizando tratamientos térmicos o alta presión, que favorecen el acceso de las enzimas y mejora la eficiencia de la hidrólisis. Sin embargo, algunos estudios han reportado casos donde la aplicación de altas presiones reduce el grado de hidrólisis de la  $\beta$ -lactoglobulina cuando se utiliza tripsina, mientras que se observa un efecto contrario con otras enzimas como *Neutrase*®, *Alcalase*®, *Savinase*®, *Elastase* y *Thermolysin* (Bamdad et al., 2017). Además de estas técnicas, existen otros métodos de pretratamiento tales como extrusión, sonicación, radiación de microondas, electricidad pulsada y ultrasonicación por multifrecuencia, que se emplean para modificar la estructura de las proteínas y facilitar su posterior hidrólisis enzimática (Uluko et al., 2014; Uluko et al., 2015; Dullius et al., 2018).

Si bien algunos estudios indican que la aplicación de pretratamientos sobre el sustrato reduce la bioactividad de los péptidos obtenidos, también se han reportado casos en los que estos procesos mejoran la actividad biológica de los mismos (Pan et al., 2022; Chen et al., 2023). Por lo tanto, la decisión de utilizar o no un pretratamiento de las proteínas lácteas depende tanto del tipo de enzima seleccionada como de las características específicas que se desean obtener en el producto final. Este enfoque es clave para optimizar el proceso hidrolítico y asegurar la calidad del producto final (Dullius et al., 2018).

### **1.6.2. Proceso hidrolítico**

En la producción de hidrolizados enzimáticos a gran escala, las enzimas de grado alimentario son las más comúnmente utilizadas. Así, uno de los acercamientos más simples consiste en utilizar enzimas libres en un proceso continuo para la reacción de hidrólisis, el cual está acoplado a un módulo de separación por membrana de ultrafiltración. Este sistema de filtración permite separar las enzimas del producto obtenido, constituyéndose en uno de los primeros pasos de purificación y acondicionamiento de los ingredientes. No obstante, como se ha detallado en secciones anteriores, el uso de enzimas inmovilizadas puede hacer el proceso económicamente viable, principalmente debido a la posibilidad de reutilización de las enzimas, lo que reduce los costos operativos.

En aplicaciones industriales en las que se busca evitar el uso de aditivos externos, la hidrólisis sin control de pH (*free-fall*) se presenta como una alternativa a la hidrólisis convencional, que normalmente se monitorea con la técnica del *pH-stat*. En esta última se adiciona una solución alcalina o ácida para mantener constante el pH durante la reacción enzimática (Adler-Nissen, 1986). Sin embargo, ante este cambio en las condiciones de hidrólisis, es factible que las bioactividades deseadas en el producto final puedan resultar diferentes y/o

comprometidas. Así, en estudios realizados con aislado de proteínas de suero lácteo, se observó que, aunque el grado de hidrólisis alcanzado fue similar en la hidrólisis tanto con control de pH como sin él, el perfil de péptidos y las bioactividades evaluadas sí resultaron alteradas (Fernández & Kelly, 2016).

Asimismo, en procesos donde se busca lograr altos grados de hidrólisis, uno de los mayores desafíos es la contaminación microbiana, ya que estos procesos suelen requerir tiempos de hidrólisis prolongados. Para prevenir este problema, una de las técnicas más comunes es el uso de conservantes bacteriostáticos o bactericidas en el proceso de producción, aunque su uso no es recomendado cuando se pretende utilizar el hidrolizado para consumo humano o animal. En este sentido, existen otras alternativas, como el tratamiento con UV, la aplicación de campo eléctrico pulsado, ozono, alta presión o la microfiltración del sustrato, que ayudarían a reducir la carga microbiana inicial y mejorar la seguridad del proceso (Dullius et al., 2018).

Otro aspecto a tener en cuenta al seleccionar un determinado grado de hidrólisis es el impacto que pueda llegar a tener sobre la eficiencia del tratamiento térmico posterior, especialmente destinado a inactivar la hidrolasa utilizada. Por ejemplo, se ha visto que la enzima *Coralase*® PP es más sensible al calor cuando se alcanza un mayor grado de hidrólisis del concentrado de proteínas de suero lácteo (aproximadamente 21%), en comparación con grados de hidrólisis más bajos (alrededor del 10%). Esta enzima mostró mayor estabilidad en presencia de un mayor contenido de sólidos totales, lo que estaría relacionado con un aumento en la viscosidad de la solución y, por ende, con una menor transferencia de calor (Conesa & FitzGerald, 2013). Este comportamiento podría indicar que la combinación de un bajo contenido de sólidos totales y un alto grado de hidrólisis da lugar a una inactivación enzimática más eficiente por calor, lo que tiene implicancias importantes a nivel industrial, tanto en términos de costos energéticos como de estabilidad del producto (Dullius et al., 2018).

### **1.6.3. Tratamiento del producto obtenido**

En la actualidad, la industria alimentaria se centra principalmente en el desarrollo de técnicas de enriquecimiento en lugar de técnicas de purificación. Mientras que las técnicas de purificación son útiles para obtener productos puros de alta calidad, las técnicas de enriquecimiento tienen la ventaja de permitir la obtención de productos de alto rendimiento que son comercializables como ingredientes bioactivos, todo ello a través de procesos económicamente viables. Este enfoque hacia el enriquecimiento responde a la creciente demanda de ingredientes funcionales, cuya eficacia y rentabilidad son factores cruciales para su incorporación en productos alimenticios. De esta forma, las técnicas de enriquecimiento permiten no solo mantener las propiedades bioactivas de los ingredientes, sino también optimizar la rentabilidad del proceso de producción, facilitando la comercialización de los productos finales (Agyei et al., 2016).

En este contexto, los métodos cromatográficos comúnmente utilizados en la industria farmacéutica para la producción de bioactivos han sido descartados en gran medida debido a los elevados costos que conllevan. Los procesos de purificación en la industria farmacéutica, por ejemplo, representan más del 50% de los costos de producción, y aproximadamente el 90% del costo total del proceso posterior a la producción. Debido a estas limitaciones, la industria alimentaria ha comenzado a desarrollar alternativas más rentables, como la separación por membranas, específicamente mediante técnicas como la ultrafiltración y la nanofiltración. Estas tecnologías no sólo permiten reducir costos, sino que también preservan las propiedades funcionales del producto y facilitan su escalabilidad, lo que las convierte en una opción atractiva para el procesamiento de ingredientes bioactivos (Agyei & Danquah, 2011).

Otra alternativa son los métodos cromatográficos no convencionales, que emplean columnas basadas en esferas y no requieren de bajos caudales ni alta presión. Entre estos métodos se encuentran la cromatografía de membrana, un proceso de purificación utilizado industrialmente para la separación de proteínas que combina la ultrafiltración y la cromatografía; la cromatografía de adsorción de membrana como método de intercambio iónico de alto rendimiento; y la cromatografía de adsorción en columna con carbón activado. También es posible mencionar como alternativa a las técnicas cromatográficas convencionales, el sistema acuoso de dos fases, un método de separación libre de cromatografía desarrollado recientemente (Bhut et al., 2011; Voswinkel & Kulozik, 2011; Hippauf et al., 2014; Jiang et al., 2017).

Otro paso importante del tratamiento de los hidrolizados obtenidos es la conservación. De la misma forma que la elección de la enzima o del grado de hidrólisis afectan el producto final, los métodos de secado utilizados para conservar ingredientes alimentarios pueden alterar las propiedades fisicoquímicas y biofuncionales de los péptidos contenidos (Dullius et al., 2018; Kleekayai et al., 2022).

Los procesos térmicos permiten transformar corrientes líquidas en polvos más estables y con mayor vida útil. Al mismo tiempo, contribuyen a la reducción de los costos asociados al almacenamiento y transporte (Abdullah et al., 2024). La liofilización y el secado por pulverización son algunos de los métodos térmicos más comúnmente utilizados para la obtención de polvos secos, tanto a escala de laboratorio como en las industrias. Cada uno posee su propia metodología, así como ventajas y desventajas particulares.

Por un lado, la liofilización se basa en la sublimación del agua contenida en un producto congelado adecuadamente mediante la aplicación de alto vacío en sistemas denominados liofilizadores. Generalmente, se utiliza para productos sensibles al calor y/o para obtener productos secos de alta calidad, debido a su capacidad limitada para inducir reacciones químicas y microbiológicas. Entre sus desventajas se encuentran el menor rendimiento, el volumen de

trabajo limitado, el elevado costo y el tiempo de procesamiento. Por su parte, el secado por aspersión consiste en la impulsión del líquido a presión a través de atomizadores de pequeño diámetro, en presencia de aire caliente, lo que permite su pulverización en gotas finas y facilita la rápida evaporación del agua. Es un proceso continuo que involucra un tiempo de procesamiento corto con mayores rendimientos. Sin embargo, el uso de altas temperaturas ( $>100^{\circ}\text{C}$ ) y la consecuente modificación química o degradación de los productos debido a este tratamiento térmico, constituyen sus principales desventajas (Rezvankehah et al., 2020; Kleekayai et al., 2022; Xie et al., 2023).

Una vez obtenidos los ingredientes en polvo es fundamental evaluar tanto los factores externos de almacenamiento y distribución como las características intrínsecas que determinan la estabilidad de almacenamiento. Entre los factores externos se encuentran la intensidad lumínica, el nivel de oxígeno, la permeabilidad del envase, la temperatura y la humedad relativa. Mientras que, dentro de las características intrínsecas de los productos se encuentran la hidrofobicidad superficial, la presencia de azúcares reductores, el contenido de humedad, el pH, la temperatura de transición vítrea, el grado de hidrólisis, la humectabilidad, entre otras características. Tanto los factores externos como las características intrínsecas de los productos pueden dar lugar a distintos cambios físicos y/o químicos similares a los que se presentan en todo sistema en polvo. Entre los cambios físicos es posible mencionar la aglomeración, la pegajosidad, el apelmazamiento y el colapso estructural, mientras que los cambios químicos posibles comprenden reacciones de pardeamiento no enzimático y oxidación lipídica (Rao et al., 2016).

En definitiva, los productos alimentarios que podrían incorporar en su formulación hidrolizados proteicos con propiedades tecnofuncionales y biológicas de relevancia representan un sector en creciente demanda que requiere de investigaciones y avances en múltiples áreas, aspectos y factores de influencia, que contribuyan tanto a ampliar como a garantizar el potencial uso de péptidos derivados de proteínas alimentarias.

### **1.7. Consideraciones finales**

La inmovilización de enzimas para la hidrólisis de proteínas alimentarias representa un avance significativo frente a los métodos convencionales que emplean enzimas solubles. Este enfoque, como se ha mencionado previamente, no sólo permite un control preciso de la hidrólisis, sino que también minimiza la formación de productos no deseados, mejora la estabilidad de las enzimas y aumenta la resistencia a inhibidores y productos químicos. Además, la inmovilización reduce la autólisis y posibilita la reutilización de los biocatalizadores, optimizando la viabilidad económica de procesos hidrolíticos (Migneault et al., 2004b; Hussain et al., 2018; Manzo et al., 2018).

La investigación y caracterización de biocatalizadores inmovilizados es crucial para contribuir a la producción sostenible y en gran escala de hidrolizados proteicos con potenciales beneficios tanto para la salud humana como para la mejora de la calidad de productos alimentarios. En un país con una industria láctea consolidada y con una fuerte producción quesera, los avances en el área son especialmente relevantes, dado el impacto positivo que puede tener en la optimización de los procesos de producción de ingredientes con valor agregado y en el cuidado del ambiente. Así, las actividades llevadas a cabo en el marco de la presente Tesis se planificaron y ejecutaron en función de aportar mayor conocimiento a la obtención y caracterización de sistemas de inmovilización enzimática, de manera tal de dar una respuesta eficiente y potencialmente escalable a un proceso de particular interés científico y tecnológico como lo es la obtención de péptidos bioactivos a partir de un subproducto de la industria láctea.

## **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS DEL TRABAJO**

### **2.1. Objetivo general**

Desarrollar e implementar derivados insolubilizados de enzimas hidrolíticas que contribuyan al aprovechamiento de subproductos de interés agroalimentario con énfasis en el diseño de nuevos alimentos funcionales.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Estudiar las enzimas hidrolíticas más factibles de ser empleadas en la obtención de hidrolizados de proteínas.
- Diseñar soportes a partir de materiales orgánicos de bajo costo y química multifuncional, con adaptación de sus propiedades a las enzimas de interés a través de modificaciones químicas y físicas de su superficie y entramado tridimensional.
- Sintetizar biocatalizadores insolubles con alta actividad y estabilidad a las diversas condiciones fisicoquímicas del medio de reacción a partir de preparaciones enzimáticas comerciales y empleando diferentes estrategias de inmovilización.
- Obtener de forma cuantitativa hidrolizados (escalado) empleando los mejores derivados. Optimización de las condiciones de producción. Estudio de sus características fisicoquímicas, propiedades biológicas y tecnofuncionales. Comparación con aquellos obtenidos con la enzima libre.
- Analizar la viabilidad de la tecnología desarrollada como generadora de potenciales aditivos alimentarios nutracéuticos: desarrollo de una metodología *in vitro* de simulación del entorno fisicoquímico del sistema digestivo.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

El concentrado de proteínas de suero lácteo 80 (80 g de proteína por 100 g de muestra, WPC-80) se adquirió de la empresa *Arla Foods Ingredients S.A.* (Córdoba, Argentina) bajo el nombre comercial de *Lacprodan 80*. Las enzimas *Alcalase*® 2,4 L (EC 3.4.21.62; actividad específica de 2,4 U/g) de *Bacillus licheniformis* y *Flavourzyme*® 500 L (EC 3.4.11.1; actividad específica  $\geq$  500 LAPU/g) de *Aspergillus oryzae* provienen de *Novozymes A/S* (Bagsværd, Dinamarca).

Los reactivos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, Estados Unidos) e incluyen la 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TT), el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), la caseína de leche bovina, y otros como el fluoruro de fenilmetanosulfonilo, la hipuril-L-histidil-L-leucina (HHL), y la L-tirosina. También se obtuvieron de Sigma-Aldrich Corp., el persulfato de potasio, las proteínas  $\beta$ -LB y BSA, la sal diamónica del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), la sal disódica del ácido bicinconínico (BCA) y la solución acuosa de glutaraldehído al 25% (v/v). Los ácidos utilizados (acético al 99,5%, clorhídrico, fosfórico al 85%, tricloroacético y trifluoroacético), junto con el acetato de sodio, el bicarbonato de sodio, el carbonato de sodio, el citrato de sodio, el cloruro de calcio, el cloruro de manganeso, el cloruro de sodio, el dioxano, el etanol, el fosfato de sodio dibásico, el fosfato de sodio monobásico, el glicerol, el hidróxido de sodio, la sacarosa, el tartrato de sodio, el *Tris*-Base y la urea, fueron adquiridos de Cicarelli Laboratorios S.A. (Santa Fe, Argentina). El cloruro de zinc y el carbonato de litio se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania), el sulfato de cobre (II) de Fluka AG (Buchs, Suiza) y los sulfatos de cobalto (II), magnesio (II) y níquel (II) de Mallinckrodt (Dublín, Irlanda). El colorante *Coomassie Blue G-250* fue provisto por LKB BROMMA (Villeneuve-la-Garenne, Francia) y el quitosano por Polymar Ind. Ltda (Fortaleza, Brasil). El acetonitrilo se obtuvo de JT Baker (Madrid, España) y el borohidruro de sodio de Carlo Erba Reagents S.A. (Barcelona, España).

Los medios de cultivo utilizados (Agar Nutritivo y Caldo Soja-Tripticasa) fueron provistos por Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia) y las resinas cromatográficas por GE Healthcare (Chicago, Estados Unidos). El microscopio óptico Olympus BH-2, equipado con un sistema de cámara réflex digital Nikon D3100, se adquirió de Olympus Corporation (Tokio, Japón). El equipo Heto FD 2.5 fue suministrado por Thermo Electron Corporation (Leicestershire, Reino Unido), el fermentador BioStat A Plus MO 5 L 230 Vac por Sartorius Stedim Biotech GmbH, el liofilizador Heto FD 2.5 por Heto Lab Equipment (Allerød, Dinamarca) y el secador *spray* de laboratorio BÜCHI Mini *Spray Dryer* B-290 por BÜCHI Labortechnik AG (Flawil, Suiza). El horno de secado por microondas AVC80 con balanza incorporada es de la empresa

CEM Corporation (Matthews, Estados Unidos) y el espectrómetro de luminiscencia LS 50B de PerkinElmer (Waltham, Estados Unidos). El analizador termogravimétrico (TGA) modelo Q500 es de la marca TA Instruments (New Castle, Estados Unidos), mientras que el espectrómetro infrarrojo (FT-IR) modelo 8201PC es de la marca Shimadzu (Kioto, Japón). Por último, el microscopio electrónico de barrido empleado fue el Phenom-World modelo Pro de mesada de Thermo Fisher Scientific (Eindhoven, Países Bajos), con un sistema de *sputtering* de muestras de la misma marca.

### **3.2. Caracterización bioquímica, funcional y cinética de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado libre**

La caracterización de los biocatalizadores con potenciales aplicaciones en la síntesis de hidrolizados bioactivos es esencial para comprender su comportamiento antes de cualquier proceso de inmovilización. Estos ensayos iniciales proporcionan una base de referencia clave, permitiendo identificar posibles cambios o alteraciones que puedan ocurrir durante la inmovilización de las enzimas. En este sentido, tanto *Alcalase*® como *Flavourzyme*® fueron caracterizadas desde el punto de vista bioquímico, funcional y cinético mediante ensayos de incubación y de actividad, bajo diversas condiciones (**Tabla 1**).

La caracterización bioquímica implicó la evaluación de la actividad enzimática a distintas temperaturas y valores de pH, así como el estudio del efecto de la adición de iones metálicos sobre dicha actividad. Por su parte, la caracterización funcional de las enzimas se realizó mediante ensayos de estabilidad térmica, estabilidad frente al pH, además de estudios de productividad. Finalmente, la caracterización cinética se llevó a cabo utilizando distintas concentraciones de enzima y sustrato a la temperatura y pH óptimo de cada enzima.

#### **3.2.1. Determinación de la actividad enzimática**

La actividad de las enzimas se determinó siguiendo el método de Kunitz (1947), con algunas modificaciones (Ait Braham et al., 2019).

Las soluciones de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® se prepararon en *buffer* carbonato 100 mM (pH 9) o en *buffer* fosfato 100 mM (pH 7), respectivamente. La solución de caseína se preparó a una concentración de 10 mg/mL en el *buffer* correspondiente. Su disolución se realizó bajo agitación constante con aumento gradual de la temperatura (sin sobrepasar los 80°C), seguida de un ajuste de pH una vez alcanzada la disolución completa (solución transparente de color azul tenue). Antes de iniciar el ensayo de hidrólisis, la caseína se incubó a 50°C durante 5 min y, posteriormente, la mezcla de reacción se mantuvo a temperatura constante durante 10 min. La mezcla de reacción consistió en 0,5 mL de caseína 10 mg/mL y 0,6 mL de solución de *Alcalase*® 0,008% (m/v) o de solución de *Flavourzyme*® 0,13% (m/v). La concentración final de las enzimas

## *Materiales y métodos*

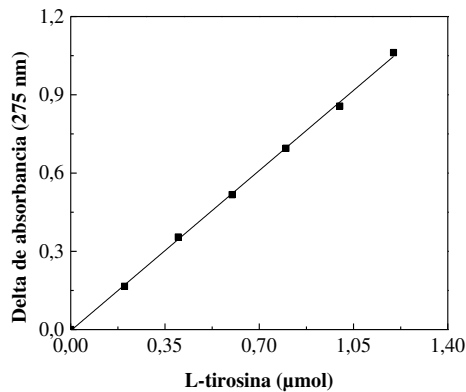
en la reacción fue 0,004% (m/v), en el caso de *Alcalase*®, y 0,07% (m/v), en el caso de *Flavourzyme*®. Adicionalmente, se incluyeron los blancos de reacción. Para *Alcalase*® se realizó la mezcla caseína en *buffer*, sin enzima; mientras que, para *Flavourzyme*® se hicieron dos blancos, la mezcla caseína en *buffer* (sin enzima) y la mezcla de enzima en *buffer* (sin caseína).

**Tabla 1.** Resumen de las condiciones evaluadas a lo largo de los ensayos de caracterización de las enzimas en estado libre.

Caracterización	Estudios	<i>Alcalase</i> ® libre	<i>Flavourzyme</i> ® libre
Bioquímica	Condiciones óptimas	30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80°C (pH 9)	30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 y 70°C (pH 8)
		4, 6, 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10, 11 y 12 (65°C)	4, 6, 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10, 11 y 12 (50°C)
	Efecto de la adición de iones metálicos	Sales: CaCl <sub>2</sub> , CoSO <sub>4</sub> , CuSO <sub>4</sub> , Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MgSO <sub>4</sub> , MnCl <sub>2</sub> , NiSO <sub>4</sub> y ZnCl <sub>2</sub>  Concentraciones: 0,1; 1 y 2 mM	
Funcional	Estabilidad	50, 55, 60, 65, 70 y 80°C (pH 9)	40, 45, 50, 55 y 60°C (pH 7,5)
		4, 6, 8; 8,5; 9; 9,5; 10 y 12 (60°C)	5; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5 y 10,5 (50°C)
		Tiempos de incubación: 0, 10, 20, 40, 60, 120 y/o 240 min	
	Productividad	25, 30, 35, 40, 45 y 50°C (pH 9)	25, 30, 35, 40, 45 y 50°C (pH 7,5)
		4, 6; 7,5; 9 y 10 (45°C)	4, 6; 7,5; 9 y 10 (40°C)
		Tiempos de reacción: 1 y 2 h	
Cinética	Actividad con distintas concentraciones de sustrato y enzima	Enzima: 0,8; 1,5; 3 y 6 µM	Enzima: 11,8; 23,5; 46,5 y 94,1 µM
		Caseína: 0; 9,8; 24,6; 49,1; 78,6; 98,3; 147,4; 196,6 y 235,9 µM	

La reacción de hidrólisis se realizó por duplicado para cada enzima en las condiciones pre-establecidas y se detuvo añadiendo 0,5 mL de ácido tricloroacético al 20% (m/v). Después de 10 min de incubación a 4°C, las muestras se centrifugaron a 26300 × g durante 10 min (4°C) y se realizó la lectura de absorbancia de L-tirosina liberada (estándar) a 275 nm. La cantidad de L-tirosina se estimó a partir de la curva de referencia con L-tirosina (µg o µmol) versus el delta de absorbancia (275 nm), tal como se observa en el **Figura 9**. Mientras que, la actividad enzimática

se definió como la cantidad de enzima (mg) que produjo la liberación de 1  $\mu\text{mol}$  de L-tirosina por min, bajo las condiciones pre-establecidas de cada ensayo.



**Figura 9.** Curva de referencia con L-tirosina para los ensayos de determinación de la actividad enzimática.

### **3.2.2. Estudios de temperatura y pH óptimos**

La búsqueda de las condiciones donde las enzimas son más activas implicó evaluar su actividad (**sección 3.2.1**) a distintas temperaturas, por un lado, y a distintos valores de pH, por otro.

En una primera instancia, la actividad enzimática de *Alcalase*<sup>®</sup> se analizó en el rango de temperaturas de 30 a 80°C (pH 9). Por su parte, la actividad enzimática de *Flavourzyme*<sup>®</sup> se evaluó entre 30 y 70°C (pH 8). En una segunda instancia, se analizó la actividad de ambas enzimas en un rango de pH de 4 a 12 a la temperatura en la que se registró la máxima actividad, es decir, a 65°C para *Alcalase*<sup>®</sup> y a 50°C para *Flavourzyme*<sup>®</sup>.

Los resultados se expresaron como actividad relativa (%), tomando como 100% la mayor actividad de las enzimas obtenida a determinadas condiciones de temperatura o de pH.

### **3.2.3. Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH**

La estabilidad de las enzimas se evaluó incubándolas a distintas temperaturas, por un lado, y a distintos valores de pH, por otro.

En una primera instancia, se analizó la estabilidad térmica incubando 0,5 mL de solución de *Alcalase*<sup>®</sup> 0,45% (m/v) en el rango de temperaturas de 50 a 80°C (pH 9), y 4,5 mL de solución de *Flavourzyme*<sup>®</sup> 0,51% (m/v) en el rango de 40 a 60°C (pH 7,5). Durante la incubación, se extrajeron alícuotas de 0,05 mL de *Alcalase*<sup>®</sup> y de 0,6 mL de *Flavourzyme*<sup>®</sup>, que se incubaron inmediatamente en un baño de hielo durante 20 min. Posteriormente, se determinó la actividad

remanente (**sección 3.2.1**) utilizando 0,01 mL de solución de *Alcalase*® extraída o 0,15 mL de solución de *Flavourzyme*® extraída, volúmenes que permitieron alcanzar las concentraciones empleadas en los ensayos anteriores [0,004 y 0,07% (m/v), respectivamente]. Las condiciones de temperatura y pH para la determinación de la actividad fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de la **sección 3.2.2**, es decir, 65°C y pH 9 para *Alcalase*®, y 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®.

En una segunda instancia, se analizó la estabilidad frente al pH incubando 0,5 mL de solución de *Alcalase*® 0,45% (m/v) en un rango de pH de 4 a 12 (60°C) y 4,5 mL de solución de *Flavourzyme*® 0,51% (m/v) en un rango de pH de 5 a 10,5 (50°C). Se procedió de la misma manera que en la evaluación de la estabilidad térmica.

Los tiempos de extracción definidos fueron 0, 10, 20, 40, 60, 120 y/o 240 min. Los resultados se expresaron como actividad relativa (%), tomando como 100% la actividad de las enzimas a tiempo cero.

### 3.2.3.1. Parámetros de inactivación

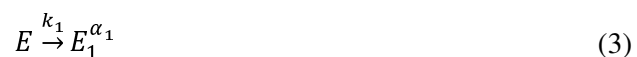
La inactivación de enzimas sigue una cinética que se ajusta adecuadamente a un modelo decayente de primer orden (**ec. 1**):

$$-\frac{dE}{dt} = k_1 E \quad (1)$$

Donde E es la actividad específica de la enzima y  $k_1$  la constante de inactivación exponencial de primer orden. Esta cinética describe la rotura de un solo enlace en un único evento de inactivación, involucrando una transición de un solo paso (**ec. 2**) entre la forma activa (E) y la forma desnaturalizada ( $E_d$ ), completamente inactiva. Se trata de un modelo de inactivación exponencial de primer orden:



Este comportamiento puede ocurrir, aunque en general la inactivación no es completa (en la mayoría de los casos), por lo que la inactivación en un solo paso conduce a un estado final que presenta actividad residual (**ec. 3**):



Donde  $\alpha_1$  es la relación entre la actividad del estado final ( $E_1$ ) y la actividad del estado inicial ( $E$ ). El estado enzimático  $E_1$  es estable y no se desnaturaliza ni se inactiva a otro estado enzimático. De esta forma, el modelo de inactivación sería representado por una cinética exponencial decayente (de no primer orden).

El modelo de dos parámetros propuesto por Sadana & Henley (1987) para representar la cinética de inactivación enzimática pretende describir la estabilización de la actividad enzimática, siendo un caso especial del mecanismo general en serie (**ec. 4**):



Donde  $k_1$  y  $k_2$  son las constantes de inactivación de primer orden y se asume que los estados enzimáticos  $E$ ,  $E_1$  y  $E_2$  tienen diferentes actividades.

Con  $k_2 = 0$ , se interpreta que la enzima transiciona únicamente a un estado intermedio parcialmente activo  $E_1$ , y que el estado  $E_2$  carece de actividad (enzima completamente desnaturalizada). Esto convierte un modelo de inactivación de cuatro parámetros (**ec. 4**) en uno de dos parámetros (**ec. 3**), y la expresión matemática de la actividad en función del tiempo (**ec. 5**) es la siguiente:

$$\text{Actividad enzimática relativa (\%)} = (100 - \alpha_1)e^{-k_1 t} + \alpha_1 \quad (5)$$

Donde, como se mencionó anteriormente,  $\alpha_1$  representa la relación entre la actividad del estado final evaluado ( $E_1$ ) y la actividad del estado inicial ( $E$ ),  $k_1$  es la constante de inactivación (en unidades de tiempo<sup>-1</sup>) y  $t$  es el tiempo.

La principal utilidad del modelo de Sadana-Henley radica en que permite analizar inactivaciones enzimáticas que aparentan ser de primer orden, aunque la cinética real no lo sea. Es decir, el modelo puede describir inactivaciones que ocultan comportamientos cinéticos más complejos, tales como inactivación bifásica, con período de gracia o con período de activación (Polakovič & Vrabel, 1996).

La inactivación bifásica es la desviación más común de la cinética de primer orden, donde se presenta una curva de doble exponencial con dos fases, siendo la segunda más lenta. La primera fase concluye cuando se agota la forma enzimática más lábil. Por su parte, la inactivación con período de gracia se caracteriza por tener una fase inicial lenta, seguida de una aceleración de la inactivación. Durante la fase inicial, la enzima puede sufrir cambios sin pérdida de actividad, lo cual podría ocurrir si se da una reacción reversible entre  $E$  y  $E_1$  o si la concentración inicial de

una de las formas activas de la enzima es negativa. Por último, la inactivación con período de activación implica un aumento inicial de la actividad hasta alcanzar un máximo, seguido por una disminución. Este comportamiento podría asociarse con la presencia de una distribución inicial determinada de varias formas enzimáticas.

El ajuste de los datos se llevó a cabo utilizando el programa *OriginPro* 9.0 64Bit. A partir de los parámetros obtenidos del ajuste ( $k_1$  y  $\alpha_1$ ) se calculó el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), que representa el tiempo necesario para que la actividad se reduzca al 50% respecto al valor inicial.

En la mayoría de los casos, se aplicó un ajuste de regresión exponencial simple decreciente, siguiendo la ecuación (**ec. 6**):

$$y = y_0 + A_1 e^{\frac{-x}{t_1}} \quad (6)$$

Comparando esta ecuación con la de Sadana-Henley, y representa la actividad enzimática relativa,  $y_0$  es  $\alpha_1$ ,  $\frac{1}{t_1}$  corresponde a  $k_1$  y  $A_1$  representa  $(100-\alpha_1)$ . En cuanto al  $t_{1/2}$  (**ec. 7**), se calculó de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} y &= y_0 + A_1 e^{\frac{-x}{t_1}} \\ 50 &= y_0 + A_1 e^{\frac{-x_{1/2}}{t_1}} \\ 50 - y_0 &= A_1 e^{\frac{-x_{1/2}}{t_1}} \\ \frac{50 - y_0}{A_1} &= e^{\frac{-x_{1/2}}{t_1}} \\ \ln\left(\frac{50 - y_0}{A_1}\right) &= \frac{-x_{1/2}}{t_1} \\ \ln\left(\frac{50 - y_0}{A_1}\right) \times -t_1 &= x_{1/2} \end{aligned} \quad (7)$$

Para situaciones específicas de inactivación rápida o frente a la posible presencia de un estado de transición o período de gracia, se utilizaron otro tipo de regresiones.

Cuando las enzimas se inactivaron rápidamente, se empleó la regresión lineal (**ec. 8**), ya que el modelo se redujo a uno exponencial decayente de primer orden:

$$y = a + bx \quad (8)$$

Donde  $\alpha_1$  toma el valor de cero. En cuanto al  $t_{1/2}$  se calculó despejando  $x$  de la **ec. 8**, de la siguiente manera (**ec. 9**):

$$\begin{aligned} y &= a + bx \\ 50 &= a + bx_{1/2} \\ 50 - a &= bx_{1/2} \\ \frac{50 - a}{b} &= x_{1/2} \end{aligned} \quad (9)$$

Mientras que, la  $k_1$  (**ec. 10**) se calculó a partir de la ecuación de Sadana-Henley, teniendo en cuenta el  $t_{1/2}$  previamente estimado:

$$\text{Actividad enzimática relativa (\%)} = (100 - \alpha_1)e^{-k_1 t} + \alpha_1$$

$$50 = (100 - \alpha_1)e^{-k_1 t_{1/2}} + \alpha_1$$

$$50 - \alpha_1 = (100 - \alpha_1)e^{-k_1 t_{1/2}}$$

$$\frac{50 - \alpha_1}{100 - \alpha_1} = e^{-k_1 t_{1/2}}$$

$$\ln\left(\frac{50 - \alpha_1}{100 - \alpha_1}\right) = -k_1 t_{1/2}$$

$$\frac{\ln\left(\frac{50 - \alpha_1}{100 - \alpha_1}\right)}{-t_{1/2}} = k_1 \quad (10)$$

En los casos donde las enzimas mostraron dos estados enzimáticos parcialmente activos (inactivación bifásica), tal como se aprecia en la **ec. 4**, se aplicó una regresión de doble exponencial decreciente (de no primer orden) (**ec. 11**):

$$y = y_0 + A_1 e^{\frac{-x}{t_1}} + A_2 e^{\frac{-x}{t_2}} \quad (11)$$

Al igual que en la exponencial simple decreciente,  $y_0$  representó  $\alpha_1$  y  $k_1$  y  $k_2$  se calcularon como  $\frac{1}{t_1}$  y  $\frac{1}{t_2}$ , respectivamente. Teniendo en cuenta los valores de estos parámetros y que, para el caso en que el 50% de la actividad se alcanzó en la etapa 1, la expresión de la etapa 2 es despreciable, el  $t_{1/2}$  (**ec. 12**) se despejó de la ecuación de Sadana-Henley de la siguiente manera:

$$\text{Actividad enzimática relativa (\%)} = (100 - \alpha_1)e^{-k_1 t} + \alpha_1$$

$$50 = (100 - \alpha_1)e^{-k_1 t_{1/2}} + \alpha_1$$

$$50 - \alpha_1 = (100 - \alpha_1)e^{-k_1 t_{1/2}}$$

$$\frac{50 - \alpha_1}{100 - \alpha_1} = e^{-k_1 t_{1/2}}$$

$$\ln\left(\frac{50 - \alpha_1}{100 - \alpha_1}\right) = -k_1 t_{1/2}$$

$$\frac{\ln\left(\frac{50 - \alpha_1}{100 - \alpha_1}\right)}{-k_1} = t_{1/2} \tag{12}$$

En los casos en que las enzimas presentaron cierta estabilidad antes de la inactivación (período de gracia), se utilizó la regresión logística (**ec. 13**):

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \tag{13}$$

En esta ecuación  $A_2$  representa  $\alpha_1$ ,  $k_1$  se calculó como se describe en la ecuación (**ec. 10**) y el  $t_{1/2}$  (**ec. 14**) se estimó de la siguiente manera a partir del valor de  $\alpha_1$  obtenido:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2$$

$$50 = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x_{1/2}}{x_0}\right)^p} + A_2$$

$$50 - A_2 = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x_{1/2}}{x_0}\right)^p}$$

$$1 + \left(\frac{x_{1/2}}{x_0}\right)^p = \frac{A_1 - A_2}{50 - A_2}$$

$$\left(\frac{x_{1/2}}{x_0}\right)^p = \frac{A_1}{50} - 1$$

$$\frac{x_{1/2}}{x_0} = \sqrt[p]{\frac{A_1 - A_2}{50 - A_2} - 1}$$

$$x_{1/2} = \sqrt[p]{\frac{A_1 - A_2}{50 - A_2} - 1} \times x_0 \tag{14}$$

Por último, los datos estimados se analizaron utilizando la ecuación de Arrhenius (**ec. 15**), la cual describe el efecto de la temperatura sobre las reacciones químicas, es decir la dependencia térmica de las reacciones químicas, en este caso aplicada sobre la inactivación enzimática:

$$\ln(k_1) = -\frac{E_a}{R}x + AR \tag{15}$$

Donde  $E_a$  representa la energía de activación necesaria para la inactivación térmica,  $R$  es la constante universal de los gases (8,314 J/mol·K),  $x$  es el recíproco de la temperatura en Kelvin, y  $AR$  corresponde a la actividad enzimática relativa a dicha temperatura.

Por lo tanto, a partir de la regresión lineal (**ec. 8**) de la curva de los logaritmos de las constantes de inactivación en función de las inversas de las temperaturas (**ec. 15**) se calcularon las  $E_a$  (**ec. 16**), las entalpías ( $\Delta H$ , **ec. 17**), las energías libres de Gibbs ( $\Delta G$ , **ec. 18**) y las entropías ( $\Delta S$ , **ec. 19**) de la siguiente manera:

$$y = a + bx; \text{ donde la pendiente } b \text{ es } -\frac{E_a}{R}$$

$$b = -\frac{E_a}{R}$$

$$b \times -R = E_a \tag{16}$$

$$\Delta H = E_a - RT \tag{17}$$

$$\Delta G = -RT \times \ln\left(\frac{k_1 h}{KT}\right) \quad (18)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (19)$$

Donde h es la constante de Planck ( $1,10 \times 10^{-35}$  J·min) y K es la constante de Boltzmann ( $1,38 \times 10^{-23}$  J/K).

#### **3.2.4. Estudios cinéticos**

La actividad de las enzimas (**sección 3.2.1**) se evaluó utilizando diferentes concentraciones de caseína (0-235,9  $\mu$ M) y distintas concentraciones de enzima (0,8-6  $\mu$ M de *Alcalase*® y 11,8-94,1  $\mu$ M de *Flavourzyme*®). Las condiciones de temperatura y pH fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de la **sección 3.2.2**, es decir, 65°C y pH 9 para *Alcalase*®, y 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®.

Los parámetros cinéticos se estimaron mediante la cinética de Michaelis-Menten (**ec. 20**), para el caso de *Alcalase*®, y la cinética de Hill (**ec. 21**), para el caso de *Flavourzyme*®.

$$V = \frac{V_{max} \times S}{k_m + S} \quad (20)$$

$$V = V_{max} \frac{S^n}{K_{0,5}^n + S^n} \quad (21)$$

Donde  $V_{max}$  representa la velocidad máxima de reacción; S es la concentración de sustrato;  $K_m$  o  $K_{0,5}$  es la constante de Michaelis-Menten o la concentración de sustrato en la que la velocidad de reacción es la mitad de  $V_{max}$ , respectivamente; y n es la constante de Hill, que refleja la cooperatividad o la influencia de la unión enzima-sustrato sobre la afinidad de otras moléculas de sustrato. Una cooperatividad positiva indica que la primera unión enzima-sustrato incrementa la afinidad del resto de las zonas de interacción, haciendo que la enzima sea más sensible a las variaciones en la concentración de sustrato. Mientras que, una cooperatividad negativa implica una reducción de la afinidad por otras moléculas de sustrato, resultando en una enzima menos sensible a cambios en su concentración (Leskovac, 2003; Banerjee et al., 2012). Asimismo, el valor de n también está relacionado de manera indirecta con el número de sitios de unión que podría tener una enzima. Por lo tanto, cuando n es mayor que 1, es probable que la enzima posea múltiples sitios de unión.

Para estos cálculos, se tuvieron en cuenta las masas moleculares promedio de las enzimas [27277 g *Alcalase*®/mol (Doucet et al., 2003; Ferreira et al., 2003) y 29431 g *Flavourzyme*®/mol (**Anexo 1.1**)], así como las de la L-tirosina (181,19 g/mol) y de las caseínas de la leche (23121 g/mol).

### **3.2.5. Estudios de productividad**

La productividad de las enzimas se entiende como la capacidad de hidrólisis en función del tiempo, considerando variables como la temperatura, el pH y el tiempo de la reacción. Por lo tanto, se evaluó la hidrólisis de caseína a tiempos mayores a los 10 min empleados en los ensayos de caracterización anteriores, tanto a distintas temperaturas como a distintos valores de pH.

Para analizar la productividad en función de la temperatura, se estudió la actividad (**sección 3.2.1**) de *Alcalase*® (pH 9) y *Flavourzyme*® (pH 7,5) en un rango de temperaturas de 25 a 50°C durante 1 y 2 h de reacción. Mientras que, para evaluar la productividad en función del pH, se estudió la actividad (**sección 3.2.1**) de *Alcalase*® (45°C) y *Flavourzyme*® (40°C) en un rango de pH de 4 a 10 durante 1 y 2 h de reacción.

Los resultados se expresaron como actividad relativa (%), tomando como 100% la mayor actividad de las enzimas obtenida a determinadas condiciones de temperatura o pH y de tiempo.

### **3.2.6. Efecto de la adición de iones metálicos sobre la actividad enzimática**

El efecto de la presencia de iones metálicos (CaCl<sub>2</sub>, CoSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, NiSO<sub>4</sub> y ZnCl<sub>2</sub>) sobre la actividad de las enzimas se evaluó mediante la adición de distintas concentraciones de sales (0,1, 1 y 2 mM) a la reacción descrita en la **sección 3.2.1**. Para esto, se preparó una solución madre de cada sal a una concentración de 20 mM, de la cual se utilizaron 5,5, 55 y 110 µL en la mezcla de reacción (1,1 mL). Esta mezcla contenía 0,5 mL de caseína y 0,1 mL de solución de *Alcalase*® al 0,05% (m/v) o 0,15 mL de solución de *Flavourzyme*® al 0,51% (m/v). Los volúmenes de solución enzimática empleados permitieron alcanzar las concentraciones de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® utilizadas en ensayos anteriores [0,004 y 0,07% (m/v), respectivamente]. Las condiciones de temperatura y pH fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de la **sección 3.2.2**, es decir, 65°C y pH 9 para *Alcalase*®, y 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®.

Los resultados se expresaron como actividad relativa (%), tomando como 100% la actividad de las enzimas en ausencia de sales.

### **3.3. Estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con *Alcalase*® en estado libre**

El estudio de la influencia de las variables operativas durante el proceso de hidrólisis y la caracterización de hidrolizados obtenidos mediante el uso de la enzima *Alcalase*® en estado libre se han llevado a cabo previamente en el grupo de investigación (Fenoglio et al., 2012; Fenoglio et al., 2013; Vierling et al., 2015; Fenoglio et al., 2016). Del análisis de los resultados, se observó una disminución del contenido de péptidos hidrofóbicos (responsables del sabor amargo) y una mejora en los atributos sensoriales en comparación con las proteínas nativas del suero (Fenoglio et al., 2016). Seguidamente, otros trabajos han permitido estudiar la presencia de actividades biológicas, tales como propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antihipertensivas, así como la presencia de algunas propiedades funcionales representativas, como capacidad espumante, emulsionante y solubilidad, empleando grados de hidrólisis inferiores al 20%. Los hidrolizados obtenidos mostraron excelentes propiedades inhibitorias de la enzima convertidora de la angiotensina, logrando una inhibición del 100% para concentraciones de 3% (m/v). Los hidrolizados también presentaron actividad antimicrobiana, con halos inhibitorios destacados frente a dos cepas Gram-positivas: *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, patógenos comúnmente implicados en enfermedades de transmisión alimentaria (Eberhardt et al., 2017).

Estos resultados prometedores resaltan la necesidad de profundizar en el conocimiento de las propiedades encontradas en los hidrolizados obtenidos mediante transformaciones enzimáticas. Para ello, se consideró fundamental llevar a cabo estudios de fraccionamiento de las actividades biológicas observadas, de forma tal de identificar los rasgos distintivos (carga, tamaño, hidrofobicidad) de los compuestos bioactivos (Pan et al., 2012; Conway et al., 2013; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2014; Ma et al., 2016). Asimismo, se analizó el efecto de altos grados de hidrólisis (>20%) sobre las características de los hidrolizados con el objetivo de enriquecer el conocimiento del grupo de investigación y contribuir al desarrollo de ingredientes bioactivos para su incorporación en matrices alimentarias de base láctea (Welderufael & Jauregi, 2010; Adjonu et al., 2013; Cheison & Kulozik, 2017).

En base a la mayor capacidad de escisión de los enlaces peptídicos conferida por *Alcalase*® en comparación con *Flavourzyme*® (Eberhardt et al., 2021), y teniendo en cuenta sus diferentes acciones catalíticas (amplia especificidad y baja selectividad en *Alcalase*® frente a una mayor selectividad en *Flavourzyme*®), se decidió utilizar exclusivamente *Alcalase*® en estado libre para los estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con grados de hidrólisis superiores al 20%, lo que permitió avanzar en el entendimiento de los hidrolizados, complementando así los conocimientos previos del grupo de investigación.

### **3.3.1. Preparación del WPC-80**

El concentrado de proteínas de suero lácteo se preparó al 7% (m/v) de proteínas en *buffer* carbonato 100 mM (pH 10, WPC7%). Para esto, el polvo del WPC-80 se suspendió en un 80% del volumen total y se disolvió de manera gradual a temperatura ambiente con agitación magnética. La muestra se mantuvo en agitación de 30 a 60 min, se trasvasó luego al matraz correspondiente y se almacenó a 4°C *overnight*. De acuerdo a las determinaciones de nitrógeno realizadas al concentrado de proteínas de suero comercial, el mismo contenía un 67,81 g proteínas por 100 g de muestra en base húmeda.

Antes de iniciar la hidrólisis, la solución de WPC7%, disuelta en *buffer* carbonato 100 mM (pH 10), se ajustó a la temperatura de reacción, registrándose un pH en el rango de 8 a 9.

### **3.3.2. Hidrólisis del WPC-80**

La reacción de hidrólisis de la solución de WPC7% se llevó a cabo a 50°C, pH 9,25 (ajustado a la temperatura de reacción), respetando la relación enzima/sustrato 15% (m/m) de proteínas y el protocolo propuesto por Eberhardt et al. (2019). Para ello, se utilizó un reactor tipo batch, un agitador magnético y un electrodo de pH.

El reactor tipo batch consistió en un vaso de precipitado doble camisa, conectado a un baño con recirculación de agua que permitió mantener constante la temperatura de hidrólisis. El electrodo de pH, junto con una bureta de titulación, facilitó el control y mantenimiento del pH de reacción, mediante la adición de hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M (**Figura 10**). Con el fin de determinar el grado de hidrólisis (DH) alcanzado mediante el método del *pH-stat* descrito en la **sección 3.3.3**, se tomó registro de los volúmenes de NaOH consumidos en el tiempo. Finalmente, la reacción se detuvo mediante inactivación térmica de *Alcalase*® a 95°C durante 5 min. Los hidrolizados (WPH) obtenidos se almacenaron a -20°C para su liofilización y posterior análisis.



**Figura 10.** Sistema experimental empleado para la hidrólisis enzimática del WPC-80.

Se realizaron los controles (WPC) correspondientes sometiendo a la solución de WPC7% a las mismas condiciones de hidrólisis, pero en ausencia de *Alcalase*®, por lo que no se aplicó el tratamiento térmico.

Es importante aclarar que, en una primera instancia, la hidrólisis de la WPC7% se llevó a cabo a una escala menor con el fin de determinar la relación enzima/sustrato [% (m/m)] que permitiese obtener, en un tiempo viable, hidrolizados con altos DH (>20%). Para ello, se emplearon 60 mL de la solución de WPC7% y distintas relaciones enzima/sustrato [1-15% (m/m) de proteínas]. En una segunda instancia, la hidrólisis se realizó con 300 mL de sustrato y, las muestras obtenidas en esta etapa se utilizaron para los posteriores análisis de caracterización y fraccionamiento.

### **3.3.3. Determinación del grado de hidrólisis**

El grado de hidrólisis se determinó empleando el método del *pH-stat* (Fenoglio et al., 2016). El mismo se basa en la desprotonación de los grupos carboxilo y  $\alpha$ -amino liberados durante la hidrólisis de enlaces peptídicos en medio alcalino. La desprotonación provoca una reducción en el pH del medio, lo que permite estimar el DH alcanzado a partir del volumen consumido de NaOH. Para esto, se empleó la siguiente fórmula (**ec. 22**):

$$DH(\%) = 100 \times B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{total}} \quad (22)$$

Donde B es el volumen de NaOH requerido para mantener el pH constante, en mililitros;  $N_b$  es la molaridad del NaOH empleado;  $\alpha$  es el grado de disociación promedio de los grupos  $\alpha$ -amino liberados en la hidrólisis;  $M_p$  es la masa de proteínas de la muestra, en gramos; y  $h_{total}$  es el número total de enlaces peptídicos presentes en el sustrato ( $h_{total, WPC-80} = 8,8$  meqv/g).

El valor de  $\alpha$  (**ec. 23**) se determinó como:

$$\alpha = \frac{10^{(pH-pK)}}{1 + 10^{(pH-pK)}} \quad (23)$$

Siendo pK el valor de disociación promedio de los grupos  $\alpha$ -amino liberados durante la hidrólisis, que depende de la temperatura, la longitud de la cadena peptídica y de la naturaleza del aminoácido terminal. Este valor se calculó empleando la ecuación (**ec. 24**) propuesta por Camacho et al. (2001):

$$pK = 3,8 + 0,45 \times pH \quad (24)$$

#### **3.3.4. Caracterización de los hidrolizados obtenidos**

La caracterización de los hidrolizados obtenidos a partir de la hidrólisis de proteínas de suero con *Alcalase*® es fundamental para evaluar su potencial en aplicaciones alimentarias y biológicas. En esta sección, se analizaron las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los hidrolizados, buscando correlacionar sus características con actividades bioactivas relevantes, tales como propiedades antioxidantes, antihipertensivas y antimicrobianas. Estos análisis permitieron, por un lado, profundizar en la relación entre las características fisicoquímicas de los hidrolizados y sus propiedades funcionales, susceptibles de ser aprovechadas en la industria alimentaria y farmacéutica; y por otro, contribuir al conocimiento y los hallazgos generados por el grupo de investigación.

##### *3.3.4.1. Análisis de propiedades biológicas de interés*

La caracterización biológica de las muestras obtenidas implicó la evaluación de tres bioactividades: actividad antioxidante (AAO), actividad antihipertensiva (AAH) y actividad antimicrobiana (AAM). Para ello, las muestras de hidrolizados y sus respectivos controles sin hidrolizar se prepararon a distintas concentraciones [1, 3 y 10% (m/v)] y valores de pH (6, 7 y libre), empleando agua ultrapura para la reconstitución y ácido clorhídrico (HCl) y/o NaOH 1 M, para el correspondiente ajuste del pH.

Este enfoque permitió examinar el potencial de los hidrolizados no solo para influir positivamente en la salud humana, mediante la reducción del estrés oxidativo, la regulación de la presión arterial y la prevención de infecciones, sino también para mejorar la calidad y conservación de los productos alimentarios, prolongando su vida útil al prevenir el deterioro por microorganismos y evitando el estrés oxidativo.

##### **3.3.4.1.1. Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el reactivo ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o ABTS, según el protocolo descrito por Re et al. (1999). Esta técnica se fundamenta en la generación del radical del reactivo (ABTS<sup>•+</sup>) con persulfato de potasio y la posterior incubación del radical con la muestra durante 7 min en oscuridad.

La formación del radical se llevó a cabo, 16 h antes de las determinaciones, disolviendo el ABTS en *buffer* fosfato 5 mM (pH 7,4) a una concentración de 7 mM y añadiendo persulfato de potasio a una concentración de 2,45 mM, con conservación inmediata en oscuridad a

temperatura ambiente. Para ello, se tuvo en cuenta que la adición de 20  $\mu\text{L}$  de persulfato de potasio a 480  $\mu\text{L}$  de ABTS permite realizar entre 45 y 50 determinaciones.

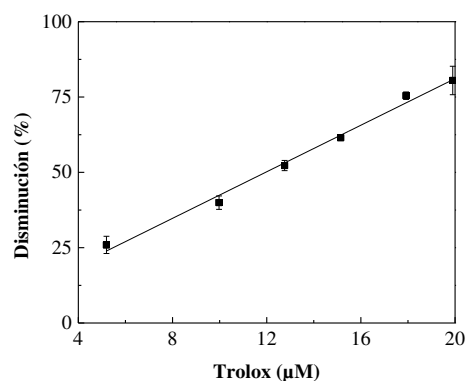
La solución de trabajo del  $\text{ABTS}^+$  se preparó disolviendo el mismo en *buffer* fosfato [1/90-1/100 (v/v)] hasta lograr una absorbancia de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm. La incubación de 1 mL del radical  $\text{ABTS}^+$  y 2-40  $\mu\text{L}$  de muestra (a la dilución correspondiente) se realizó en oscuridad, a temperatura ambiente y durante 7 min. El volumen de reacción utilizado para cada muestra, analizada por triplicado, fue aquel que permitió una disminución de entre el 20% y el 80% de la absorbancia del radical sin reaccionar, siendo menor para las muestras de partida y mayor para las fracciones cromatográficas.

Los resultados se expresaron como capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (TEAC), en mM o  $\mu\text{M}$  de Trolox según la concentración determinada, empleando la ecuación (**ec. 25**):

$$TEAC = \frac{\left[ \frac{A_0 - A_7}{A_0} \times 100 \right] - I}{m} \quad (25)$$

Donde  $A_0$  es la absorbancia inicial del  $\text{ABTS}^+$ ,  $A_7$  es la absorbancia luego del tiempo de reacción, e I (intercepción) y m (pendiente) son los valores obtenidos a partir de la curva de referencia con Trolox (estándar; 5,2-20  $\mu\text{M}$ ).

En la **Figura 11** se presenta una de las curvas de referencia obtenida con distintos volúmenes (1,3-5  $\mu\text{L}$ ) de una solución madre 4 mM de Trolox. Para estimar el TEAC en mM, se debe dividir el resultado obtenido en la **ec. 25** por un factor de 1000.



**Figura 11.** Curva de referencia con Trolox para los ensayos de determinación de la AAO.

Es importante aclarar que el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) es un análogo sintético hidrosoluble de la vitamina E que se utiliza frecuentemente como estándar de referencia en diversas reacciones de óxido-reducción, debido a su elevado poder antioxidante.

#### 3.3.4.1.2. Actividad antihipertensiva

Se evaluó mediante el ensayo de inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual desempeña un papel importante en la regulación de la presión arterial, ya que cataliza la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, un potente vasoconstrictor (Hayakari et al., 1978; Cian et al., 2011).

El ensayo consistió en la reacción entre el sustrato HHL (3 mg/mL) y la ECA en presencia de cloruro de sodio (NaCl) y de muestra. Después de 45 min de incubación a 37°C, el ácido hipúrico liberado por la ECA se detectó mediante la adición de 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina (TT) en dioxano, preparado a una concentración de 30 mg/mL. En la **Tabla 2** se detallan los volúmenes de cada reactivo y demás consideraciones que se tuvieron en cuenta a la hora de realizar el ensayo.

**Tabla 2.** Detalle de las condiciones y los volúmenes de reactivos necesarios para determinar la AAH.

Reactivos	A <sub>BE</sub>	A <sub>BS</sub>	A <sub>E</sub>	A <sub>S</sub>
<i>Baño de hielo molido</i>				
NaCl* (μL)	15	15	15	15
HHL (μL)	20	-	20	20
Buffer (μL)	195	195	195	175
Muestra (μL)**	-	20	-	20
ECA (μL)	-	20	20	20
<i>Incubación a 37°C, durante 45 min</i>				
ECA (μL)	20	-	-	-
TT (μL)	665	665	665	665
Buffer (μL)	1100	1100	1100	1100

El ensayo se realizó por duplicado para cada muestra.

\* El NaCl debe colocarse cuidadosamente en el fondo del tubo de microcentrífuga, ya que la actividad de la enzima podría verse afectada.

\*\* a la dilución correspondiente.

Siglas: HHL: Hipuril-L-histidil-L-leucina (sustrato); ECA: Enzima convertidora de angiotensina; TT: 2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina.

Al adicionar TT se logró la formación de un compuesto coloreado al reaccionar con el ácido hipúrico liberado por la enzima. Este compuesto presenta su máxima absorbancia a 382 nm. Luego de dar tiempo a la formación de color (5-10 min), se realizó una centrifugación a  $9498 \times g$  durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a 382 nm y la actividad antihipertensiva se expresó como porcentaje de inhibición de la ECA, empleando la siguiente ecuación (**ec. 26**):

$$AHA (\%) = 100 - \left[ \frac{A_S - A_{BS}}{A_E - A_{BE}} \times 100 \right] \quad (26)$$

Donde  $A_S$  es la absorbancia de la ECA en presencia de sustrato y muestra;  $A_{BS}$  es la absorbancia de la ECA en presencia de muestra (sin sustrato);  $A_E$  es la absorbancia de la ECA en presencia del sustrato (sin muestra); y  $A_{BE}$  es la absorbancia del sustrato (sin ECA ni muestra).

#### 3.3.4.1.3. Actividad antimicrobiana

Se evaluó utilizando el método de difusión en agar, descrito por Cardoso et al. (2012). Este método implica la siembra de 60  $\mu\text{L}$  de muestra en orificios de 7 mm de diámetro y 5 mm de profundidad, dispuestos en placas que contienen 15 mL de Agar Nutritivo al 2% (m/v) adicionadas con el inóculo correspondiente.

Las cepas utilizadas fueron *Bacillus cereus* DBFIQ B 7 (BC), *Cronobacter sakazakii* DBFIQ CS 1 (CS), *Escherichia coli* ATCC 8739 (EC), *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 24 (LM) y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 29213 (SA), seleccionadas entre bacterias patógenas y/o alterantes de alimentos, que se prepararon a una concentración inicial en placa de  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL (según recuento microbiológico previo). Las mismas se reactivaron previamente en Caldo Soja-Tripticasa a partir de sus conservados en ultrafreezer a  $-80^\circ\text{C}$ , habiéndose efectuado dos resiembras sucesivas en 5 mL de caldo por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ . Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad dentro de un flujo laminar clase II-A modelo *CellGard*<sup>TM</sup> HD ES NU-481-600 de la marca *Nuair* (Minneapolis, Estados Unidos).

Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 16-24 h después de haber realizado la siembra de las muestras. Al finalizar el tiempo de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición, los cuales indicaron la presencia de actividad antimicrobiana en las muestras, las que se analizaron por duplicado.

*3.3.4.2. Estudio de las características fisicoquímicas de los péptidos involucrados en la actividad biológica de los hidrolizados mediante estrategias separativas*

El fraccionamiento de los hidrolizados mediante técnicas cromatográficas se llevó a cabo con el objetivo identificar las características fisicoquímicas de los extractos responsables de las propiedades bioactivas observadas en la sección anterior. Al correlacionar estas características con la bioactividad, se buscó obtener una mejor comprensión de los compuestos bioactivos presentes en los hidrolizados, lo que permitirá optimizar sus futuras aplicaciones en formulaciones alimenticias y terapéuticas.

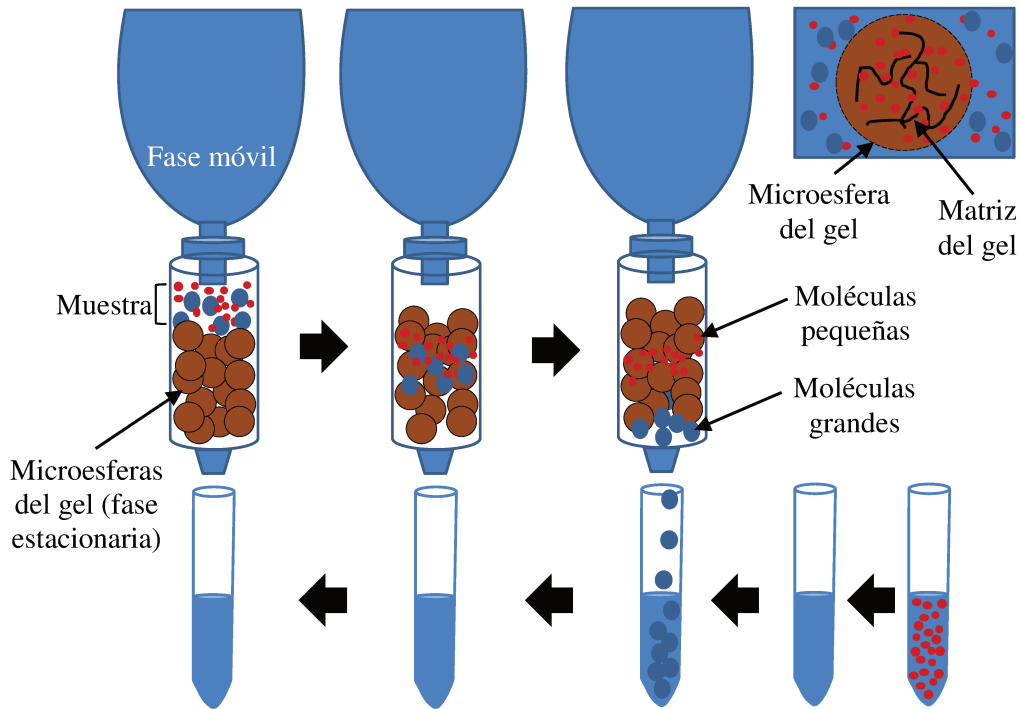
Como muestra de partida, se utilizaron los hidrolizados obtenidos previamente, liofilizados y preparados a una concentración de 4% (m/v) en *buffer* fosfato 50 mM (pH 7). Estos fueron acondicionados mediante centrifugación a  $10000 \times g$  durante 10 min a 4°C e inmediata filtración utilizando membranas de *Nylon* de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (WPH-CF). Los precipitados remanentes recuperados luego de la centrifugación se denominaron WPH-P.

Se recolectaron fracciones de 3 mL en todas las técnicas cromatográficas, a las que se les midió la absorbancia a 220, 230, 254 y 280 nm. En función del perfil de elución obtenido, las fracciones fueron agrupadas y denominadas como FA (fracciones agrupadas), a las cuales se les determinó la actividad antioxidante (**sección 3.3.4.1.1**), la actividad antihipertensiva (**sección 3.3.4.1.2**) y el contenido de proteína (**sección 3.3.4.3**).

3.3.4.2.1. Cromatografía de filtración en gel (GFC)

El fraccionamiento de los hidrolizados por tamaño se realizó utilizando el gel *Sephadex* G-25, un polímero formado por el entrecruzamiento de dextrano con epíclorhidrina. Este entrecruzamiento permite la formación de poros que posibilitan la separación de moléculas de entre 1000 a 5000 Da (**Figura 12**).

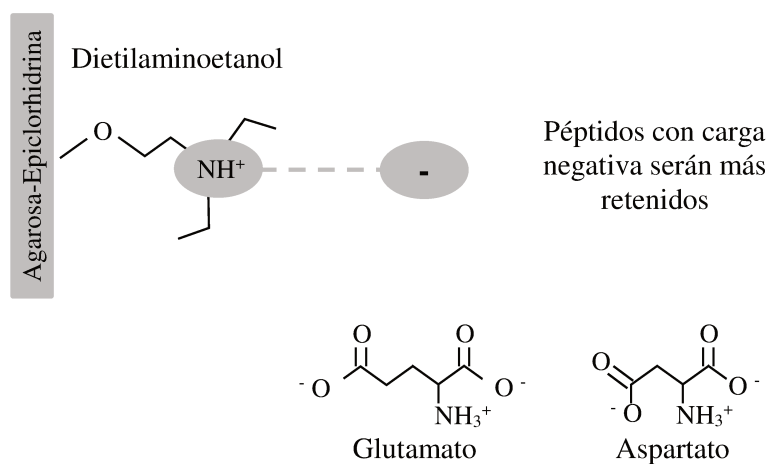
La columna cromatográfica [1,07 cm (diámetro)  $\times$  55 cm (alto)] se rellenó con 47 mL de gel [1,07 cm (diámetro)  $\times$  52,1 cm (alto)], el cual fue desgasificado previamente mediante sonicación durante 30 min y filtración al vacío en kitosato. A continuación, la columna se equilibró con dos volúmenes de columna de *buffer* fosfato 50 mM (pH 7), también desgasificado por filtración al vacío. Posteriormente, se sembraron 2,5 mL de muestra y su elución con el *buffer* de equilibrado se llevó a cabo a un flujo de  $0,52 \pm 0,02$  mL/min, empleando una bomba peristáltica Masterflex L/S 07522-28 con cabezal Easy-Load II 77201-62 (Vernon Hills, Estados Unidos).



**Figura 12.** Esquema de funcionamiento de la columna de cromatografía de filtración en gel. Figura modificada de Striegel et al. (2009).

### 3.3.4.2.2. Cromatografía de intercambio aniónico débil (IEC-DEAE)

El fraccionamiento de los hidrolizados por carga se realizó utilizando la resina DEAE-*Sepharose*, compuesta por entrecruzamientos de agarosa y epiclorhidrina y el contraión dietilaminoetanol (**Figura 13**). Este último es el que permite el intercambio de aniones entre la fase estacionaria y la muestra.



**Figura 13.** Esquema de la cromatografía de intercambio aniónico débil.

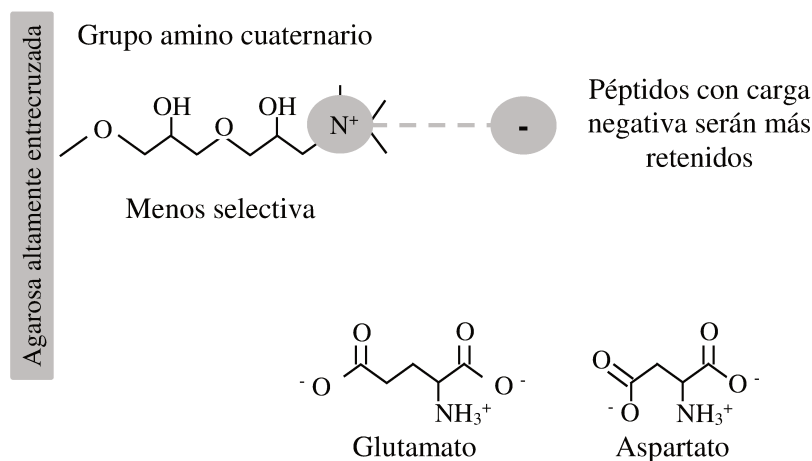
La columna cromatográfica, rellena con 7,4 mL de gel [1,48 cm (diámetro) × 4,3 cm (alto)], se equilibró con *buffer* fosfato 50 mM (pH 7). La muestra se diluyó en *buffer* de

equilibrado a una relación 1/20 (v/v) y 50 mL de esta mezcla se recircularon durante 1 h, hasta absorbancia constante a 280 nm. La elución se realizó por gradiente escalonado, mediante el agregado de concentraciones crecientes de NaCl al *buffer* de partida, desde 0,1 M hasta 2,5 M. Cada cambio se llevó a cabo cuando la absorbancia alcanzaba un valor constante, similar al registrado durante la recirculación de la muestra. El flujo utilizado fue  $1,63 \pm 0,04$  mL/min.

#### 3.3.4.2.3. Cromatografía de intercambio aniónico fuerte (IEC-Q)

El fraccionamiento de los hidrolizados por carga se realizó también utilizando la resina *Q-Sepharose Fast Flow*, compuesta por agarosa altamente entrecruzada (6%) y grupos amonios cuaternarios, que actúan como intercambiadores aniónicos (**Figura 14**).

La columna cromatográfica, rellena con  $7,66 \pm 0,12$  mL de gel [1,48 cm (diámetro)  $\times$  4,45  $\pm$  0,07 cm (alto)], se equilibró con *buffer* fosfato 50 mM (pH 7). Las condiciones de trabajo y el procedimiento fueron iguales a los utilizados para la IEC-DEAE.



**Figura 14.** Esquema de la cromatografía de intercambio aniónico fuerte.

#### 3.3.4.2.4. Cromatografía de intercambio catiónico fuerte (IEC-SP)

El fraccionamiento de los hidrolizados por carga se realizó también utilizando la resina *SP-Sepharose Fast Flow*, compuesta por agarosa altamente entrecruzada (6%) con grupos de intercambio de cationes fuertes de sulfopropilo (**Figura 15**).

La columna cromatográfica, rellena con  $7,31 \pm 0,36$  mL de gel [1,48 cm (diámetro)  $\times$  4,25  $\pm$  0,21 cm (alto)], se equilibró con *buffer* fosfato 50 mM (pH 7). Las condiciones de trabajo y el procedimiento fueron los mismos que los empleados para la IEC-DEAE.

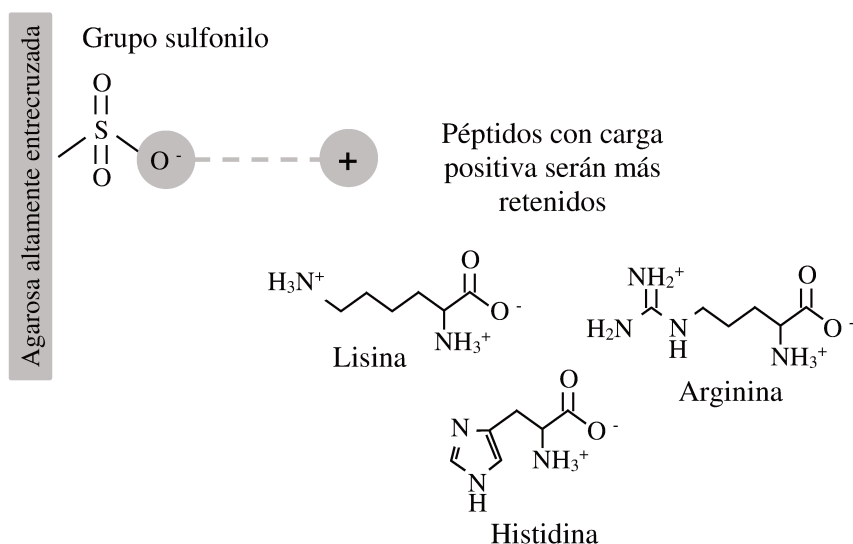


Figura 15. Esquema de la cromatografía de intercambio catiónico fuerte.

### 3.3.4.2.5. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

El fraccionamiento de los hidrolizados según sus potenciales características hidrofóbicas se realizó utilizando el gel *Phenyl-Sepharose* (Figura 16), compuesto por agarosa reticulada (6%) y modificada con grupos fenilo aromáticos terminales, unidos a la matriz mediante enlaces éter no cargados, químicamente estables. Los grupos fenilos permiten la unión de compuestos hidrofóbicos a través de interacciones de ese tipo (fuerzas de Van der Waals, dipolo transiente-dipolo transiente, fuerzas de London, entre otras).

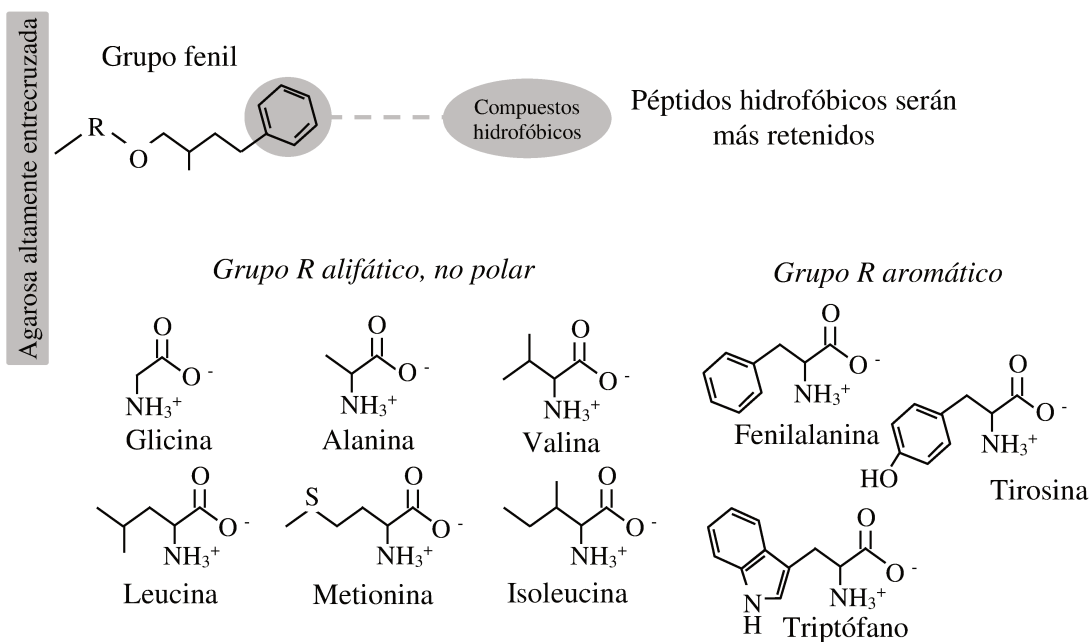


Figura 16. Esquema de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

A diferencia de las cromatografías anteriores, la columna cromatográfica rellena con 5,3 mL de gel [1,5 cm (diámetro) × 3 cm (alto)] se equilibró con *buffer* fosfato 50 mM (pH 7) que contenía NaCl 3,5 M. La muestra se diluyó en una relación 1/20 (v/v) y se le adicionó NaCl sólido hasta lograr la misma concentración que contenía el *buffer* de equilibrado. Se recircularon 50 mL de esta mezcla durante 1 h, hasta absorbancia constante a 280 nm, lo que permitió la adherencia de prácticamente la totalidad de los péptidos a la resina por medio del efecto *salting-out*. La elución se realizó de manera escalonada mediante el agregado de concentraciones decrecientes de NaCl al *buffer* de partida, finalizando con el uso de *buffer* fosfato 50 mM (pH 7). Cada cambio se realizó cuando se registró un valor de absorbancia constante, similar al observado durante la recirculación de la muestra. El flujo utilizado fue 1,5 mL/min.

#### 3.3.4.2.6. Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC)

Las muestras de partida y las fracciones agrupadas obtenidas a partir de las cromatografías se analizaron por HPLC en fase reversa con el fin de caracterizar el perfil y distribución de los péptidos presentes. Para esto se utilizó un equipo Waters 1525 constituido por una bomba binaria con detector de absorbancia Waters 2487 (longitud de onda de lectura: 215 nm) y una columna VARIAN Microsorb MV 300-5 C18 (250 x 4,6 mm x ¼”), aplicando una temperatura constante de 30°C y un gradiente de elución que implicó dos fases móviles [A: ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% en agua y B: TFA 0,1% en acetonitrilo], según el protocolo descrito por Fenoglio et al. (2016).

#### 3.3.4.3. Determinación del contenido proteico

La determinación del contenido proteico se realizó inicialmente utilizando el método de Bradford, descrito en la **sección 3.4.1**. Sin embargo, debido a que la cantidad de proteína presente en las fracciones cromatográficas agrupadas era pequeña, se recurrió a otro método, el del ácido bicinconínico propuesto por Walker (2002). Este método se basa en la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  por la acción de proteínas o péptidos. En medio alcalino, los enlaces peptídicos presentes en estos compuestos se acomplejan con el  $\text{Cu}^{2+}$ , provocando su reducción. El ion  $\text{Cu}^{+}$  resultante forma un quelato con dos moléculas de la sal disódica del ácido bicinconínico, dando lugar a la formación de un color púrpura intenso, cuya máxima absorbancia se registra a 562 nm. La aparición de esta coloración está relacionada con la estructura macromolecular de las proteínas, el número de enlaces peptídicos y la presencia de cuatro aminoácidos particulares, la L-cisteína, la L-cistina, el triptófano y la tirosina.

Para llevar a cabo el ensayo, se mezclaron 2 mL del reactivo de trabajo estándar (**Anexo 2.1**) con 0,1 mL de muestra a la dilución correspondiente. Después de 30 min de incubación a 60°C, y una vez que la mezcla de reacción tomó temperatura ambiente, se realizó la lectura de la

absorbancia a 562 nm. Los resultados, obtenidos por duplicado para cada muestra, se expresaron como cantidad de proteína en µg, teniendo en cuenta la curva de referencia realizada con BSA.

### **3.4. Estudios de inmovilización**

Considerando la necesidad de mejorar la estabilidad y reutilización de las enzimas, así como su adaptación a procesos de mayor escala, se realizaron estudios de inmovilización orientados a obtener biocatalizadores insolubles con potencial aplicación industrial. Estos estudios se estructuraron en tres etapas. En primer lugar, se evaluaron distintas técnicas de inmovilización y, en base a los resultados obtenidos, se procedió a seleccionar una de ellas para los estudios posteriores. En segundo lugar, se analizó el efecto de distintas concentraciones de agente activante sobre la inmovilización de ambas enzimas, seleccionando una concentración específica para la siguiente etapa. Por último, se evaluó la dependencia de la inmovilización de las enzimas con el tiempo de incubación.

#### **3.4.1. Determinación del contenido proteico**

La determinación del contenido proteico se llevó a cabo utilizando el método de Bradford (1976) modificado por Walker (2002). Este método, sencillo y práctico, se basa en la unión del colorante *Coomassie Blue G-250* a las proteínas. Dicha unión se presenta con el colorante en su forma aniónica, donde adquiere una coloración azul con una absorbancia máxima a 595 nm de longitud de onda. Por lo tanto, la cantidad de proteína se puede estimar a través de la determinación de la cantidad de colorante en su forma iónica azul. Para esto, se incubaron 1 mL de reactivo de Bradford (**Anexo 3.1**) y 1 mL de muestra (a la dilución correspondiente) en oscuridad durante 10 min a temperatura ambiente. El ensayo se realizó por duplicado para cada muestra y el estándar utilizado para la realización de la curva de calibrado fue BSA.

#### **3.4.2. Determinación de la actividad enzimática**

La determinación de la actividad de las muestras se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita en la **sección 3.2.1**. El volumen de muestra utilizado fue aquel que permitió alcanzar valores apreciables de actividad enzimática dentro del tiempo y volumen final de reacción estipulados en dicha sección. Las condiciones de temperatura y pH fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de la **sección 3.2.2**, es decir, 65°C y pH 9 para *Alcalase*® y 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®.

Para la evaluación de la actividad enzimática de los biocatalizadores insolubilizados, en la mayoría de los casos, se utilizó una masa de 0,3 g en 8 mL de una solución de caseína 10 mg/mL. Luego de 10 min de reacción a la temperatura y pH estipulados en la **sección 3.2.2**, se extrajeron 1,1 mL de mezcla de reacción, a los que se añadieron 0,5 mL de ácido tricloroacético

al 20%. Posteriormente, se continuó con el procedimiento descrito en la **sección 3.2.1**. Los resultados se expresaron como actividad total, es decir, los  $\mu$ moles de L-tirosina liberados por min (UI), bajo las condiciones de ensayo. El blanco consistió en una solución de caseína en ausencia de biocatalizador.

### **3.4.3. Obtención de las partículas de quitosano**

Las partículas de quitosano se obtuvieron siguiendo el método descrito por Manzo et al. (2015). Este método implicó la preparación de una solución de ácido acético al 5% (v/v) en agua destilada, en la que se disolvió quitosano a una concentración de 4% (m/v) durante 24 h a temperatura ambiente. La formación de las partículas se llevó a cabo mediante el goteo de la solución de quitosano sobre una solución de NaOH 1 M (método de coacervación), respetando la relación volumétrica solución de quitosano/solución de NaOH 1/10 (v/v). Una vez formadas, las partículas se lavaron con agua destilada hasta neutralidad, se secaron superficialmente para eliminar el exceso de agua y se almacenaron a 4°C hasta su posterior uso.

#### **3.4.3.1. Caracterización física inicial de las partículas**

La caracterización de las partículas de quitosano nativas y activadas con glutaraldehído se llevó a cabo mediante estudios de hinchamiento, tamaño y forma. Estos análisis, realizados como una primera aproximación, permitieron obtener información preliminar sobre las propiedades morfológicas de los materiales sintetizados. Dado que el objetivo principal de este trabajo fue la evaluación del desempeño de los biocatalizadores inmovilizados, la caracterización física del soporte se abordó de forma exploratoria, sentando las bases para futuros estudios más detallados.

El hinchamiento se evaluó a través de los métodos gravimétrico y volumétrico descritos por Manzo et al. (2018), mientras que el tamaño y la forma de las partículas se estudió mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM) (Manzo et al., 2015).

El método gravimétrico (**ec. 27**) y el método volumétrico (**ec. 28**) se emplearon para evaluar la porosidad y elasticidad relativa de las partículas a través del análisis de la capacidad de hinchamiento (*swelling*). La capacidad de hinchamiento se estudió a 25°C, utilizando dos soluciones *buffers*: fosfato 100 mM (pH 7) y carbonato 100 mM (pH 10). Para esto, 1 g de partículas se incubó en el *buffer* correspondiente a distintos tiempos, durante 24 h. Antes y después de la incubación, las partículas se pesaron, por un lado, y se les midió la altura alcanzada en un tubo de vidrio de base plana de 5 mL de volumen total, por otro, para calcular el porcentaje de hinchamiento, mediante las siguientes ecuaciones:

$$Swelling_{MG} (\%) = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (27)$$

$$Swelling_{MV}(\%) = \frac{h_t - h_0}{h_0} \times 100 \quad (28)$$

Donde  $Swelling_{MG}$  o  $Swelling_{MV}$  es el porcentaje de hinchamiento determinado por el método gravimétrico o volumétrico, respectivamente;  $W_0$  y  $W_t$  son el peso inicial y final de las partículas, respectivamente; y  $h_0$  y  $h_t$  son la altura inicial y final de las partículas, respectivamente, a un determinado tiempo.

El análisis con microscopía óptica, junto con un sistema de cámara réflex digital, permitió observar las características macroscópicas de las partículas, como su tamaño, forma y color. Por su parte, la microscopía electrónica de barrido se utilizó para visualizar la morfología superficial de las partículas. Para esto, las partículas se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se liofilizaron ( $5 \times 10^{-3}$  mbar,  $45^\circ\text{C}$ ). Luego, se recubrieron con una capa delgada de oro (10 nm, 18 mA, 100 s) y se analizaron con el equipo Carl Zeiss, utilizando el sistema SemAfore.

#### **3.4.4. Proceso de inmovilización**

Como se mencionó con anterioridad, el proceso de inmovilización de las enzimas se llevó a cabo en tres etapas, las cuales se resumen en la **Tabla 3**. En cada una de las etapas, se determinó el contenido proteico (**sección 3.4.1**) y/o la actividad (**sección 3.4.2**) de las muestras obtenidas (soluciones enzimáticas iniciales, sobrenadantes, lavados, controles) con el fin de realizar un balance de conservación de materia y de actividad del proceso de inmovilización.

El agua de lavado (*buffer* y agua destilada) de cada derivado y el sobrenadante constituyeron la fracción de enzima no inmovilizada. Asimismo, se evaluó la actividad práctica de los derivados (**sección 3.4.2**).

##### *3.4.4.1. Evaluación de distintas técnicas de inmovilización*

*Alcalase®* y *Flavourzyme®* se inmovilizaron sobre quitosano mediante tres técnicas diferentes, siguiendo el protocolo propuesto por Žuža et al. (2017), con algunas modificaciones. Esto permitió explorar distintos mecanismos de unión enzima-soporte, desde la adsorción física, considerada una técnica suave que preserva la estructura enzimática, hasta la inmovilización covalente, que implica una interacción más fuerte entre enzima y soporte.

**Materiales y métodos**

**Tabla 3.** Condiciones evaluadas para la inmovilización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*®.

<b>Etapa</b>	<b>Estudio</b>	<b>Características</b>	<b>Alcalase®</b>	<b>Flavourzyme®</b>
1	Técnicas de inmovilización (pH 8, T <sub>amb</sub> )	Adsorción (22 h)	5,5% (m/v)	0,3% (m/v)
		Reticulación (22 h) y unión covalente (22 h)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 5,5% (m/v)</li> <li>▪ 0,2% (v/v) de GLU para la reticulación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0,3% (m/v)</li> <li>▪ 0,004% (v/v) de GLU para la reticulación</li> </ul>
		Unión covalente (22 h)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 5,5% (m/v)</li> <li>▪ 1% (v/v) de GLU para la activación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0,3% (m/v)</li> <li>▪ 0,02% (v/v) de GLU para la activación</li> </ul>
			<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 2 h de pre-incubación enzimática</li> <li>▪ 30 min de activación del quitosano</li> </ul>	
2	Concentraciones de agente activante (T <sub>amb</sub> )	0,05; 1 y 2% (v/v) (30 min, pH 9)	0,2% (m/v) (pH 9)	0,3% (m/v) (pH 8)
			<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 15 min de pre-incubación enzimática</li> <li>▪ 2 y 4 h de inmovilización</li> </ul>	
3	Tiempo de inmovilización (T <sub>amb</sub> )	1, 2, 3, 4, 12, 24, 48 y 72 h	0,2% (m/v) (pH 9)	0,3% (m/v) (pH 8)
			<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 15 min de pre-incubación enzimática</li> <li>▪ Quitosano activado con 2% (v/v) de GLU</li> </ul>	
4	Estudios adicionales (T <sub>amb</sub> )	Concentraciones de agente activante (pH 9, 30 min)	-	0,02 y 1% (v/v)
		Concentraciones de enzima (pH 8, 15 min)	-	3,2 y 6,4% (m/v)
		Tiempos de inmovilización (pH 8)	-	2, 6 y 24 h

T<sub>amb</sub>: temperatura ambiente. GLU: glutaraldehído.

La inmovilización por adsorción se llevó a cabo incubando las soluciones enzimáticas [5,5% (m/v) de *Alcalase*® y 0,3% (m/v) de *Flavourzyme*® en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8)] durante 2 h a temperatura constante y bajo agitación (120 rpm). Posteriormente, las partículas de quitosano se mantuvieron en contacto con las soluciones enzimáticas durante 22 h, manteniendo las mismas condiciones de temperatura y agitación, y respetando la relación soporte/solución de enzima 1/10 (m/v). Al finalizar el tiempo de inmovilización, se extrajeron los sobrenadantes y los derivados finales se lavaron con *buffer* fosfato 100 mM (pH 8) seguido de agua destilada, hasta alcanzar una absorbancia constante a 280 nm. Luego, se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de agua. Además, se realizaron los controles correspondientes, que consistieron en incubar las soluciones enzimáticas bajo las mismas condiciones de inmovilización (24 h, temperatura ambiente, agitación), aunque en ausencia de soporte.

Por su parte, la inmovilización por reticulación y unión covalente se llevó a cabo incubando las soluciones enzimáticas [5,5% (m/v) de *Alcalase*® y 0,3% (m/v) de *Flavourzyme*®] en presencia de glutaraldehído durante 22 h a temperatura ambiente y bajo agitación (120 rpm). La solución de glutaraldehído se preparó en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8) al 0,2% (v/v), en el caso de *Alcalase*® y al 0,004% (v/v), en el caso de *Flavourzyme*®. Luego, se siguió el mismo procedimiento que en la inmovilización por adsorción: 22 h de incubación en presencia de partículas de quitosano y lavado posterior hasta absorbancia constante. A su vez, se realizaron los controles correspondientes, que consistieron en incubar las soluciones enzimáticas bajo las mismas condiciones de inmovilización (44 h, temperatura ambiente, agitación, en presencia de glutaraldehído a la concentración correspondiente para cada enzima), pero en ausencia de soporte.

Por último, la inmovilización por unión covalente se llevó a cabo incubando, por un lado, las soluciones enzimáticas y, por otro lado, las partículas de quitosano en presencia de glutaraldehído. Las soluciones enzimáticas se prepararon en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8) al 5,5% (m/v), en el caso de *Alcalase*® y al 0,3% (m/v), en el caso de *Flavourzyme*®, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, bajo agitación (120 rpm). Al mismo tiempo, las partículas de quitosano se activaron con glutaraldehído preparado en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8) a una concentración del 1% (v/v), en el caso de *Alcalase*®, y 0,02% (v/v), en el caso de *Flavourzyme*®. La activación se realizó durante 30 min a temperatura ambiente y bajo agitación constante (120 rpm), respetando la relación soporte/solución de glutaraldehído 1/10 (m/v). Una vez finalizados los 30 min de incubación, los soportes activados se lavaron con agua destilada hasta alcanzar una absorbancia constante a 280 nm. Posteriormente, las partículas de quitosano activadas se mantuvieron en contacto con las soluciones enzimáticas durante 22 h, manteniendo las mismas condiciones de temperatura y agitación, y respetando la relación soporte activado/solución de enzima 1/10 (m/v). Al finalizar el tiempo de inmovilización y con el fin de reducir las bases de Schiff generadas, así como los grupos aldehído que quedaron sin reaccionar, se adicionó

borohidruro de sodio sólido hasta alcanzar una concentración final de 0,5 mg/mL. Esto permitió la formación de enlaces covalentes C-N simples y estables entre la enzima y el soporte. Después de 30 min de incubación en baño de hielo, se extrajeron los sobrenadantes y los derivados finales se lavaron con *buffer* fosfato 100 mM (pH 8), seguido de agua destilada, hasta alcanzar una absorbancia constante a 280 nm. Luego, se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de agua. Al igual que en las técnicas de inmovilización anteriores, se realizaron los controles correspondientes, que consistieron en incubar las soluciones enzimáticas bajo las mismas condiciones de inmovilización (24 h, temperatura ambiente, agitación, en presencia de glutaraldehído a la concentración correspondiente para cada enzima), pero sin soporte activado.

#### *3.4.4.2. Evaluación de la influencia de distintas concentraciones de agente activante*

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos preliminares con distintas técnicas de inmovilización, se seleccionó la inmovilización covalente como la estrategia más adecuada para obtener biocatalizadores insolubilizados de *Alcalase*® y *Flavourzyme*®. La inmovilización covalente permite una unión más fuerte entre las enzimas y el soporte, lo que es crucial para garantizar la reutilización y la eficiencia a largo plazo de los biocatalizadores. Para mejorar este proceso, se evaluó la influencia de diferentes concentraciones del agente activante, dado que su concentración puede influir directamente en los parámetros de inmovilización. Para ello, la inmovilización covalente de las enzimas se llevó a cabo sobre quitosano activado con glutaraldehído en distintas concentraciones [0,05; 1 y 2% (v/v)], bajo agitación constante (120 rpm), durante 2 y 4 h a temperatura ambiente, respetando la relación soporte activado/solución de enzima 1/10 (m/v).

En este sentido, las soluciones enzimáticas se prepararon al 0,2% [(m/v), en *buffer* carbonato 100 mM (pH 9)] en el caso de *Alcalase*®, y al 0,3% [(m/v), en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8)] en el caso de *Flavourzyme*®, y se pre-incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, bajo agitación (120 rpm). Por otro lado, las partículas de quitosano se activaron con glutaraldehído preparado en *buffer* carbonato 100 mM (pH 9) a distintas concentraciones [0,5; 1 y 2% (v/v)]. La activación se realizó durante 30 min a temperatura ambiente y bajo agitación constante (120 rpm), respetando la relación soporte/solución de glutaraldehído 1/10 (m/v). Una vez finalizados los 30 min de incubación, los soportes activados se lavaron con agua destilada hasta alcanzar una absorbancia constante a 280 nm.

Posteriormente, las partículas de quitosano activadas se mantuvieron en contacto con las soluciones enzimáticas durante 2 y 4 h a temperatura ambiente y bajo agitación constante (120 rpm), respetando la relación soporte activado/solución de enzima 1/10 (m/v). Al finalizar el tiempo de inmovilización y con el fin de reducir las bases de Schiff generadas, así como los grupos aldehído que quedaron sin reaccionar, se adicionó borohidruro de sodio sólido hasta alcanzar una

concentración final de 1 mg/mL. Esto permitió la formación de enlaces covalentes C-N simples y estables entre la enzima y el soporte. Después de 30 min de incubación en baño de hielo, se extrajeron los sobrenadantes y los derivados finales se lavaron con el *buffer* de inmovilización, seguido de agua destilada, hasta alcanzar una absorbancia constante a 280 nm. Luego, se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de agua.

Se realizaron los controles correspondientes, que consistieron en incubar las soluciones enzimáticas bajo las mismas condiciones de inmovilización (2 y 4 h, temperatura ambiente, agitación, en presencia de glutaraldehído al 0,5; 1 y 2%), pero sin soporte activado.

#### *3.4.4.3. Análisis del efecto del tiempo de inmovilización*

Tras haber seleccionado la técnica de inmovilización covalente y evaluado las concentraciones de glutaraldehído, se procedió a estudiar el efecto del tiempo de inmovilización sobre la eficiencia del proceso. El tiempo de inmovilización es un parámetro crucial, ya que una exposición prolongada o insuficiente de las enzimas al soporte puede afectar la formación de enlaces covalentes y, por ende, la estabilidad y actividad de los biocatalizadores. En este sentido, se evaluó el efecto del tiempo de inmovilización covalente de las enzimas sobre quitosano activado con glutaraldehído, con el objetivo de determinar el tiempo adecuado que permita una unión efectiva de las enzimas al soporte sin comprometer su funcionalidad. Estos ensayos se realizaron bajo agitación constante (120 rpm) a temperatura ambiente, respetando la relación soporte activado/solución de enzima 1/10 (m/v).

Para esto, las soluciones enzimáticas se prepararon al 0,2% [(m/v), en *buffer* carbonato 100 mM (pH 9)] en el caso de *Alcalase*®, y al 0,3% [(m/v), en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8)] en el caso de *Flavourzyme*® y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente, bajo agitación. Por otro lado, las partículas de quitosano se activaron con glutaraldehído al 2% (v/v), preparado en *buffer* carbonato 100 mM (pH 9). La activación se realizó durante 30 min a temperatura ambiente y bajo agitación constante, respetando la relación soporte/solución de glutaraldehído 1/10 (m/v). Una vez finalizados los 30 min de incubación, los soportes activados se lavaron con agua destilada hasta alcanzar una absorbancia constante a 280 nm.

Posteriormente, las partículas de quitosano activadas se mantuvieron en contacto con las soluciones enzimáticas durante 72 h a 30°C bajo agitación constante, respetando la relación soporte activado/solución de enzima 1/10 (m/v). Durante la inmovilización, se extrajeron alícuotas de sobrenadante a distintos intervalos de tiempo (1, 2, 3, 4, 12, 24, 48 y 72 h). Al finalizar las 72 h de incubación y tras la extracción de los sobrenadantes, los derivados se re-suspendieron en el *buffer* de inmovilización y se les adicionó borohidruro de sodio sólido hasta alcanzar una concentración final de 1 mg/mL. Después de 30 min de incubación en baño de hielo, se extrajeron

los sobrenadantes de *buffer* y los derivados finales se lavaron con el *buffer* de inmovilización, seguido de agua destilada, hasta alcanzar una absorbancia constante a 280 nm. Luego, se secaron con papel de filtro para eliminar el exceso de agua. A su vez, se realizaron los controles correspondientes, que consistieron en incubar las soluciones enzimáticas bajo las mismas condiciones de inmovilización (72 h, temperatura ambiente, agitación, en ausencia o presencia de glutaraldehído al 2%), pero sin soporte activado.

Es importante aclarar que, con *Flavourzyme*®, se realizaron estudios adicionales para determinar rápidamente condiciones de inmovilización que permitieran obtener un derivado con actividad, siguiendo el protocolo previamente descrito, pero bajo nuevas condiciones experimentales. Para ello, la solución de *Flavourzyme*® se preparó en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8) a dos concentraciones diferentes [3,2 y 6,4% (m/v)]; las partículas de quitosano se activaron con glutaraldehído al 0,02 y 1% (v/v); y se evaluaron tres tiempos de inmovilización: 2, 6 y 24 h. Una vez obtenidas las nuevas versiones de *Flavourzyme*® inmovilizada, se continuó según el procedimiento ya mencionado: adición de borohidruro de sodio, incubación en baño de hielo, extracción de sobrenadantes y lavado de los derivados finales.

#### 3.4.4.4. Parámetros de inmovilización

Los parámetros de inmovilización estimados a partir de los datos de proteína y actividad fueron los siguientes:

- Proteína residual ( $P_r$ ), calculada mediante la ecuación (ec. 29):

$$P_r (\%) = \frac{P_x}{P_0} \times 100 \quad (29)$$

Donde  $P_x$  es la proteína total presente en el sobrenadante a un tiempo de inmovilización específico,  $x$  es el tiempo de inmovilización y  $P_0$  es la proteína total dada inicialmente (tiempo cero) al soporte.

- Rendimiento de inmovilización, en términos de proteína ( $\eta_p$ ), obtenido a partir de la ecuación (ec. 30):

$$\eta_p (\%) = \frac{P_i}{P_0} \times 100 \quad (30)$$

Donde  $P_i$  es la proteína teórica total inmovilizada, calculada por diferencia entre la proteína total dada al soporte ( $P_0$ ), aquella presente en los lavados y la que se encuentra en el sobrenadante remanente.

- Actividad residual ( $A_r$ ), calculada mediante la ecuación **(ec. 31)**:

$$A_r (\%) = \frac{A_x}{A_0} \times 100 \quad (31)$$

Donde  $A_x$  es la actividad total presente en el sobrenadante a un tiempo de inmovilización específico,  $x$  es el tiempo de inmovilización y  $A_0$  es la actividad total dada inicialmente (tiempo cero) al soporte.

- Rendimiento de inmovilización, en términos de actividad ( $\eta_a$ ), obtenido mediante la ecuación **(ec. 32)**:

$$\eta_a (\%) = \frac{A_i}{A_0} \times 100 \quad (32)$$

Donde  $A_i$  es la actividad teórica total inmovilizada, calculada por diferencia entre la actividad total dada al soporte ( $A_0$ ), aquella presente en los lavados y la que se encuentra en el sobrenadante remanente.

- Actividad teórica específica (AE), calculada a partir de la ecuación **(ec. 33)**:

$$AE \left( \frac{UI}{mg} \right) = \frac{A_i}{P_i} \quad (33)$$

Donde  $A_i$  y  $P_i$  son la actividad o la proteína teórica total inmovilizada, respectivamente, calculadas por diferencia entre la actividad o proteína total dada al soporte, aquella presente en los lavados y la que se encuentra en el sobrenadante remanente.

- Actividad teórica equivalente ( $AE_q$ ), obtenida mediante la ecuación **(ec. 34)**:

$$AE_q (\%) = \frac{AE_i}{AE_0} \times 100 \quad (34)$$

Donde  $AE_i$  es la actividad teórica específica inmovilizada y  $AE_0$  es la actividad específica dada inicialmente al soporte.

### 3.5. Caracterización bioquímica, funcional y cinética de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado inmovilizado

Con el objetivo de comprender el comportamiento catalítico de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado inmovilizado, y compararlo con sus formas libres, se realizaron ensayos orientados a su caracterización bioquímica, funcional y cinética. Estas evaluaciones permitieron, además, determinar el potencial de los biocatalizadores insolubilizados en aplicaciones industriales, como la hidrólisis de proteínas en condiciones controladas y su posible reutilización. La **Tabla 4** resume las condiciones experimentales bajo las cuales se llevaron a cabo los distintos ensayos.

**Tabla 4.** Resumen de las condiciones evaluadas a lo largo de los ensayos de caracterización de las enzimas en estado inmovilizado.

Caracterización	Estudios	<i>Alcalase</i> ® inmovilizada	<i>Flavourzyme</i> ® inmovilizada
Bioquímica	Condiciones óptimas	30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80°C (pH 9)	30, 40, 45, 50, 55, 60, 65 y 70°C (pH 8)
		4, 6, 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10, 11 y 12 (70°C)	4, 6, 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10, 11 y 12 (50°C)
Funcional	Estabilidad frente a la temperatura y frente al pH	60, 65, 70 y 80°C (pH 8)	35, 40, 45 y 50°C (pH 7,5)
		6, 7, 8, 9 y 10 (65°C)	5; 6,5; 7,5; 8,5 y 9,5 (35°C)
		Tiempos de incubación: 0, 30, 60, 240 y 720 min	
	Estabilidad operacional	5 ciclos de hidrólisis a 70°C y pH 8	5 ciclos de hidrólisis a 50°C y pH 7,5
	Estabilidad de almacenamiento	150 días a 4°C Tiempos de incubación: 30, 60, 90, 120 y 150 días	
Cinética	Actividad con distintas concentraciones de sustrato y masas de derivado	Caseína: 0, 49,1, 98,3, 147,4 y 196,6 µM Derivado: 0,15; 0,3 y 0,6 g	

La caracterización bioquímica implicó la evaluación de la actividad enzimática de los derivados a distintas temperaturas o a distintos valores de pH. Por su parte, la caracterización funcional de los biocatalizadores insolubilizados se realizó mediante el estudio de las siguientes estabilidades: térmica, frente al pH, operacional y durante el almacenamiento. Finalmente, la caracterización cinética se llevó a cabo utilizando distintas concentraciones de sustrato y distintas masas de derivado en los ensayos de determinación de la actividad.

La actividad de los biocatalizadores insolubles se determinó por duplicado, siguiendo la metodología descrita en la **sección 3.4.2**, en la cual la hidrólisis se realizó con 8 mL de una solución de caseína a 10 mg/mL y 0,3 g del derivado enzimático.

### **3.5.1. Estudios de temperatura y pH óptimos**

La búsqueda de las condiciones de actividad en donde los derivados son más activos implicó evaluar su actividad a distintas temperaturas, por un lado, y a distintos valores de pH, por otro.

En una primera instancia, la actividad de *Alcalase*® inmovilizada se analizó en el rango de temperaturas de 30 a 80°C (pH 9). Por su parte, la actividad de *Flavourzyme*® inmovilizada se estudió en el rango de 30 a 70°C (pH 8). En una segunda instancia, se analizó la actividad de ambas enzimas inmovilizadas en un rango de pH de 4 a 12 a la temperatura en la que se registró la máxima actividad, es decir, a 70°C para *Alcalase*® y a 50°C para *Flavourzyme*®.

Los resultados se expresaron como actividad relativa (%), tomando como 100% la mayor actividad enzimática de los derivados a las condiciones de temperatura o de pH analizadas.

### **3.5.2. Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH**

La estabilidad de las enzimas inmovilizadas se evaluó incubándolas a distintas temperaturas, por un lado, y a distintos valores de pH, por otro, manteniendo estas condiciones constantes durante el tiempo de incubación evaluado.

En una primera instancia, se analizó la estabilidad térmica incubando 6 g de derivado en el *buffer* correspondiente a temperatura constante, respetando la relación derivado/*buffer* 1/10 (m/v). En el caso de *Alcalase*®, se trabajó a 60, 65, 70 y 80°C con *buffer* Tris-HCl 100 mM (pH 8) y, en el caso de *Flavourzyme*®, las incubaciones se realizaron a 35, 40, 45 y 50°C empleando *buffer* fosfato 100 mM (pH 7,5). Durante la incubación, se extrajeron alícuotas de 1,5 g que se filtraron inmediatamente y se secaron para determinar la actividad remanente, utilizando 0,3 g de derivado y 8 mL de caseína 10 mg/mL. Las condiciones de temperatura y pH para la determinación de la actividad fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de la **sección 3.5.1**, es decir, 70°C y pH 8 para *Alcalase*®, y 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®.

En una segunda instancia, se analizó la estabilidad frente al pH incubando 6 g de derivado en el *buffer* correspondiente a temperatura constante, respetando la relación derivado/*buffer* 1/10 (m/v). En el caso de *Alcalase*®, se trabajó a pH 6, 7, 8, 9 y 10 (65°C) y, en el caso de *Flavourzyme*®, las incubaciones se realizaron a pH 5, 6,5, 7,5, 8,5 y 9,5 (35°C). Posteriormente, se continuó de la misma manera que en la evaluación de la estabilidad térmica.

Los tiempos de extracción definidos fueron 30, 60, 240 y 720 min. Los resultados se expresaron como actividad relativa (%), tomando como 100% la actividad enzimática de los derivados a tiempo cero. Los parámetros de inactivación se estimaron por regresión no lineal de datos obtenidos, siguiendo el modelo exponencial de dos parámetros de Sadana-Henley y la ecuación Arrhenius, tal como se describieron en la **sección 3.2.3.1**.

### **3.5.3. Estudios de estabilidad operacional**

La estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas se estudió sometiénolas a cinco ciclos consecutivos de hidrólisis de caseína, utilizando 0,3 g de derivado y 8 mL de caseína 10 mg/mL. Las condiciones de temperatura y pH para los ciclos de hidrólisis fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de la **sección 3.5.1**, es decir, 70°C y pH 8 para *Alcalase*®, y 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®. Luego de cada ciclo, los derivados se filtraron y lavaron con exceso de agua destilada hasta alcanzar una absorbancia constante a 280 nm.

Los resultados se expresaron como actividad relativa (%), tomando como 100% la actividad de los derivados en el primer ciclo de hidrólisis.

### **3.5.4. Evaluación de la estabilidad durante el almacenamiento**

La estabilidad durante el almacenamiento de las enzimas inmovilizadas se evaluó incubánolas a 4°C durante 150 días. La actividad se midió luego de 30, 60, 90, 120 y 150 días de almacenamiento, utilizando 0,3 g de derivado y 8 mL de caseína 10 mg/mL. Las condiciones de temperatura y pH para la determinación de la actividad fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de la **sección 3.5.1**, es decir, 70°C y pH 8 para *Alcalase*®, y 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®.

Los resultados se expresaron como actividad relativa (%), tomando como 100% la actividad de los derivados luego de haber sido sintetizados (día 0).

### **3.5.5. Estudios cinéticos**

El comportamiento y parámetros cinéticos de las enzimas inmovilizadas se evaluaron utilizando diferentes concentraciones de caseína (0-196,6  $\mu$ M) y distintas masas de derivado (0,15; 0,3 y 0,6 g). Las condiciones de temperatura y pH utilizadas fueron las seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de la **sección 3.5.1**, es decir, 70°C y pH 8 para *Alcalase*®, y 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®.

Los parámetros cinéticos se estimaron empleando la cinética de Michaelis-Menten, descrita en la **sección 3.2.4**.

### **3.6. Evaluación tecnológica de los hidrolizados obtenidos empleando los derivados sintetizados**

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de inmovilización, los biocatalizadores insolubles sintetizados se aplicaron al proceso de hidrólisis del concentrado de proteínas de suero, con el objetivo de evaluar su desempeño en condiciones de escalado. Esta etapa permitió no solo validar la funcionalidad de los derivados en un sistema de mayor volumen, sino también obtener hidrolizados con potencial aplicación en el desarrollo de ingredientes bioactivos.

Aunque las condiciones experimentales para la obtención de los hidrolizados difieren de las utilizadas en los ensayos previos con *Alcalase*® libre, el cambio fue motivado por la necesidad de adaptarse a enfoques más recientes y optimizados, tal como se propone en el protocolo de Eberhardt et al. (2025). Este protocolo involucró la producción de dos hidrolizados diferentes: uno obtenido exclusivamente por la acción de *Alcalase*® y otro producido mediante una hidrólisis secuencial con ambas enzimas, iniciando con *Alcalase*® y continuando con *Flavourzyme*®. Para ello, se buscó emular el proceso de obtención de ambos hidrolizados utilizando las enzimas inmovilizadas. Cabe destacar que los ingredientes obtenidos empleando las enzimas en estado libre, evidenciaron numerosas propiedades bioquímicas, funcionales y biológicas de interés.

Antes de proceder al escalado propiamente dicho, se llevaron a cabo pruebas pre-escalado utilizando volúmenes menores de sustrato con el objetivo de definir la temperatura de hidrólisis y la masa de catalizador inmovilizado [relación enzima/sustrato (m/m)] adecuadas para el proceso a gran escala.

#### **3.6.1. Preparación del WPC-80**

El concentrado de proteínas de suero lácteo se preparó al 8% (m/v) de proteínas en agua destilada (WPC8%). Para esto, el polvo del WPC-80 se suspendió en un 80% del volumen total y se disolvió gradualmente a temperatura ambiente con agitación magnética. La muestra se mantuvo en agitación de 30 a 60 min, se trasvasó seguidamente al matraz correspondiente y se almacenó a 4°C *overnight*, hasta su uso.

Antes de iniciar la hidrólisis, la solución de WPC8%, disuelta en agua destilada, se ajustó a la temperatura de reacción, registrándose un pH inicial de  $6,15 \pm 0,07$ , y posteriormente se llevó a pH 8,5 mediante la adición de NaOH 1 M.

#### **3.6.2. Pruebas preliminares**

La hidrólisis de la solución de WPC8% a menor escala se llevó a cabo utilizando un reactor tipo batch acoplado a un baño de recirculación térmica con control de temperatura, un electrodo de pH y una bureta de titulación, tal como se describió en la **sección 3.3.2**.

En el caso de *Alcalase*®, la hidrólisis de 60 mL de solución de WPC8% se llevó a cabo utilizando diferentes temperaturas (50, 55 y 60°C) y distintas masas de derivado [5, 10 y 15 g equivalentes a 2,2; 4,3 y 6,5% (m/m) de proteínas]. En el caso de *Flavourzyme*®, la hidrólisis de 60 mL del hidrolizado obtenido con *Alcalase*® también se realizó a diferentes temperaturas (45 y 50°C) y distintas masas de derivado [2, 5 y 8 g equivalentes a 8,6; 21,5 y 34,4% (m/m) de proteínas]. La temperatura y la relación enzima/sustrato seleccionadas fueron aquellas que permitieron obtener, en un tiempo viable, un grado de hidrólisis comparable al reportado por Eberhardt et al. (2025) (15,29±0,15 y 19,18±1,00%, respectivamente). El grado de hidrólisis se calculó empleando el método de *pH-stat* descrito en la **sección 3.3.3**, teniendo en cuenta que se utilizó NaOH 1 M para mantener constante el pH de reacción (pH 8,5).

### **3.6.3. Obtención cuantitativa de hidrolizados**

La hidrólisis de la solución de WPC8% a gran escala se llevó a cabo utilizando un fermentador *BioStat A Plus MO*, equipado con bombas peristálticas, electrodo de pH y termómetro. De las tres bombas peristálticas disponibles, sólo se utilizó una para la adición NaOH 1 M, lo que permitió mantener constante el pH de la reacción en 8,5. Para facilitar el monitoreo del proceso, se realizó un registro automático de la base consumida, el pH y la temperatura de reacción utilizando el programa *Module Operator Service (MFCS/DA, Versión 2.1, level 18, Copyright© 1994-2002, B. Braun Biotech International)*.

En el caso de *Alcalase*®, la hidrólisis de 1,5 L de solución de WPC8% se llevó a cabo a 55°C y a pH 8,5, utilizando 375 g de derivado [6,5% (m/m) de proteínas], por duplicado. Para este proceso, se utilizó un baño de agua para mantener constante la temperatura de reacción y un agitador con paletas, dado el volumen de sustrato involucrado, lo que permitió una distribución homogénea del derivado. Como se mencionó anteriormente, el sustrato almacenado a 4°C se llevó a la temperatura y pH de reacción antes de iniciar la hidrólisis. La reacción de hidrólisis se inició con el agregado de *Alcalase*® inmovilizada y, una vez alcanzado el grado de hidrólisis definido, el derivado se filtró inmediatamente y se lavó con agua corriente, seguida de agua destilada.

El hidrolizado de WPC-80 obtenido, denominado WPH-A, se trató de diferentes maneras para su posterior caracterización. Por un lado, un parte del hidrolizado se sometió a un tratamiento térmico (80°C, 20 min, 120 rpm) con el objetivo de inactivar la enzima liberada durante la hidrólisis como consecuencia, por ejemplo, de una posible erosión de las partículas. Por otro lado, una parte del volumen del hidrolizado obtenido se dejó sin tratar. Ambos hidrolizados, tratado y sin tratar térmicamente, se sometieron a dos técnicas de secado: liofilización y secado por aspersión (*spray-drying*), descritas en la **sección 3.6.3.1**. Además, 1 L de hidrolizado tratado se apartó para obtener el segundo hidrolizado, denominado WPH-AF, mediante una hidrólisis secuencial con *Flavourzyme*® inmovilizada.

La hidrólisis secuencial de 500 mL de solución de WPH-A se llevó a cabo a 50°C y a pH 8,5, utilizando 67 g de derivado [34,4% (m/m) de proteínas], por duplicado. Para este proceso, se utilizó un agitador magnético a 200 rpm, que garantizó una distribución homogénea del derivado, junto con un reactor tipo batch de vidrio de doble camisa de 1,5 L de volumen efectivo, conectado a un baño con recirculación de agua para mantener constante la temperatura de hidrólisis. La reacción se inició con el agregado de *Flavourzyme*® inmovilizada y, una vez alcanzado el grado de hidrólisis definido, el derivado se filtró inmediatamente y se lavó con agua corriente, seguido de agua destilada. El segundo hidrolizado obtenido, denominado WPH-AF, se trató de la misma manera que el WPH-A.

El uso de dos métodos de secado se fundamentó en el estudio del posible efecto que el proceso podría tener sobre diversas propiedades fisicoquímicas, tecnofuncionales y biológicas de interés presentes en los ingredientes producidos.

#### *3.6.3.1. Métodos de secado aplicados: liofilización y aspersion*

El secado por liofilización de las muestras congeladas a -18°C se realizó utilizando el liofilizador de laboratorio marca Heto, equipado con una torre Manifold (colector de vacío), siguiendo el protocolo propuesto por Kleekayai et al. (2022). La cámara de condensación de humedad operó a una temperatura de -50°C, logrando una diferencia térmica superior a 20°C entre la muestra y la cámara. El vacío final alcanzado fue de 0,2 mbar.

Por su parte, el secado por aspersion de las muestras almacenadas a 4°C se llevó a cabo con el secador *spray* de laboratorio marca Büchi, siguiendo el protocolo descrito por Islam et al. (2013) y Lavari et al. (2014), con algunas modificaciones. Se utilizó un flujo de aire de pulverización de 45 vvm (473 L aire/h), con temperaturas de entrada y salida de 165 y 75°C, respectivamente. El flujo del aspirador se ajustó al 100%, mientras que el flujo de la bomba peristáltica fue del 11%, correspondiente a un caudal aproximado de 4,5 mL/min. El flujo de agua de enfriamiento del condensador se mantuvo en 0,2 L/min, con una humedad relativa de 70% en la salida de la unidad del condensador y una temperatura de bulbo de 43°C. El vacío final alcanzado fue de 0,2 mbar.

#### *3.6.4. Caracterización de los hidrolizados*

Los hidrolizados obtenidos se caracterizaron mediante distintos ensayos para evaluar no sólo la presencia de propiedades fisicoquímicas, tecnofuncionales y biológicas, sino también para estudiar el efecto del tratamiento térmico de inactivación enzimática y del método de secado utilizado sobre la calidad global de los ingredientes obtenidos. En la **Tabla 5** se visualiza un resumen general de estos ensayos.

**Tabla 5.** Ensayos de caracterización de los hidrolizados obtenidos.

<b>Caracterización</b>	<b>Ensayos realizados</b>
Físicoquímica	Análisis termogravimétrico (TGA) Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) Humedad Microscopía electrónica de barrido RP-HPLC
Tecnofuncional	Hidrofobicidad superficial Índice de humectabilidad o mojabilidad Rendimiento del secado Solubilidad
Biológica	Actividad antioxidante

#### *3.6.4.1. Análisis termogravimétrico (TGA)*

El estudio se realizó utilizando un equipo termogravimétrico Mettler Toledo, operado con el *Software* STARe, mediante el cual se determinaron los cambios de masa en función de la temperatura. Para ello, se pesaron 5 a 10 mg de muestra en una bandeja de aluminio y se calentaron a una temperatura de entre 30 y 300°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Se utilizó una bandeja de aluminio vacía como referencia en cada prueba (Veldre et al., 2011; Tejedor et al., 2018).

#### *3.6.4.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)*

La caracterización molecular de las muestras se llevó a cabo mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. En primer lugar, el bromuro de potasio (KBr) se secó en un horno a 100±1°C durante 24 h para eliminar la humedad. Seguidamente, se preparó una mezcla de cada ingrediente con KBr en una proporción de 1:1000, la cual se molió en un mortero hasta obtener una masa homogénea. Luego, cada mezcla se prensó en una prensa hidráulica manual *Shimadzu* (Kioto, Japón) a 6 bar durante 5 min para formar una tableta sólida. A continuación, los espectros fueron registrados en un espectrómetro FTIR-8201PC *Shimadzu* (Kioto, Japón) en el rango de frecuencia de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>, con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> y 40 barridos por espectro. Para eliminar las interferencias causadas por la humedad y los gases, se utilizó el espectro del aire como referencia. Además, la línea base de cada espectro se ajustó y estandarizó para su comparación.

#### 3.6.4.3. Humedad

El contenido de humedad de los polvos obtenidos se determinó mediante el método gravimétrico (AOAC International, 2000). Para ello, una masa determinada de cada muestra se calentó en estufa a 105°C durante 24 h. Luego de enfriar las muestras a temperatura ambiente, se registraron los pesos de las muestras secas y se calculó el contenido de humedad (%) de la siguiente manera (ec. 35):

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{Peso}_{\text{inicial}} - \text{Peso}_{\text{seco}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (35)$$

#### 3.6.4.4. Microscopía electrónica de barrido

El análisis del diámetro y morfología de las partículas de los diferentes polvos se realizó a partir de las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (*Phenom-World Pro*), utilizando aumentos incrementales de 150× a 25000×. El *Software* del equipo SEM permitió determinar *in situ* el rango de tamaño de cada muestra ensayada (Kougoulos et al., 2010; Chegini et al., 2014). Asimismo, las imágenes obtenidas fueron procesadas para conocer la distribución, forma y tamaño de las partículas de cada polvo empleando el *Software* de libre acceso *ImageJ* versión 1,54k (Rasband, 1997-2025).

#### 3.6.4.5. RP-HPLC

El análisis de HPLC de fase reversa se realizó según el protocolo propuesto por Fenoglio et al. (2016), descrito en la **sección 3.3.4.2.6**. Para esto, las muestras obtenidas se reconstituyeron al 2% (m/v) en agua Milli-Q, siguiendo el protocolo propuesto por Eberhardt et al. (2025), para obtener una concentración de trabajo del 1% (m/v).

#### 3.6.4.6. Hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial se midió utilizando la sal de amonio del ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico (ANSA) como agente de fluorescencia (Chutinara et al., 2024). Para ello, en un tubo de microcentrífuga se mezclaron 2 mL de muestra a una concentración con 25 µL de una solución de ANSA 8 mM preparada en *buffer* fosfato 100 mM (pH 7). Cada muestra se preparó en un rango de concentraciones de 0,025 a 0,8 mg/mL de proteínas y se ensayó individualmente cada concentración, midiendo la fluorescencia producida. Luego de 15 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se midió la intensidad de la fluorescencia utilizando un fluorímetro modelo LS-55 marca Perkin Elmer (Waltham, Estados Unidos), equipado con una cubeta de cuarzo sub-micro de cuatro caras limpias especial para fluorescencia, a una longitud de onda de excitación y emisión de 390 y 470 nm, respectivamente. El blanco del ensayo lo

constituyó una solución *buffer* de fosfato 10 mM (pH 7) con 10 µL de solución de ANSA (control negativo). Con los resultados obtenidos, se efectuó la gráfica de intensidad de fluorescencia relativa versus la concentración (mg/mL) y se realizó el ajuste de los datos a un modelo lineal empleando el *Software OriginPro 9.0 64Bit*. La pendiente de la recta obtenida se determinó como la hidrofobicidad superficial cada muestra. Asimismo, se midió el valor de intensidad de fluorescencia de todas las muestras a las diferentes diluciones sin el agregado de ANSA (control de muestra). Todos los ensayos y controles se efectuaron por triplicado.

#### *3.6.4.7. Índice de humectabilidad o mojabilidad*

El mismo se determinó vertiendo 13 g de muestra en un embudo colocado sobre un vaso de precipitados de 400 mL que contenía 100 mL de agua destilada a 20°C. La salida del embudo se mantuvo bloqueada con una mano de mortero de vidrio, la que se retiró para permitir el contacto entre el polvo y el agua. Simultáneamente, se inició un cronómetro. El tiempo de humectabilidad se definió como el tiempo que tardaron las partículas de polvo en sumergirse completamente, mediante evaluación visual (Syll et al., 2016).

#### *3.6.4.8. Rendimiento de secado*

El rendimiento de recuperación másica se estimó a partir de las masas de polvo obtenidas mediante los métodos de secado por liofilización y aspersión. Luego de procesar el volumen total de muestra utilizado en cada caso, se estimaron las masas y se calcularon los rendimientos porcentuales en comparación con la masa inicial de la muestra de WPC8%.

#### *3.6.4.9. Solubilidad*

La solubilidad de las muestras se determinó siguiendo el método propuesto por Garofulic et al. (2016). Se colocó 1 g de polvo en un tubo de centrifuga de vidrio con 10 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente durante 1 min en un vibrador vórtex. Posteriormente, el tubo se mantuvo en un baño de agua a 37°C durante 30 min y, por último, se centrifugó (centrífuga marca Capp) a 820 × g durante 10 min. El sobrenadante obtenido se secó en una estufa de laboratorio a 105°C por 24 h o hasta alcanzar un peso constante.

La solubilidad se calculó utilizando la siguiente fórmula (ec. 36):

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{\text{Peso}_{\text{seco}}}{\text{Peso}_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (36)$$

3.6.4.10. *Actividad antioxidante*

La actividad antioxidante se evaluó utilizando el reactivo ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) y el protocolo de Re et al. (1999) descrito en la **sección 3.3.4.1.1**. Para esto, tanto los ingredientes obtenidos como los controles se reconstituyeron al 0,088% (m/v), empleando agua ultrapura.

**3.7. Análisis estadístico**

Las determinaciones se realizaron por duplicado o triplicado, según lo especificado para cada técnica empleada. Los promedios y las desviaciones estándar se calcularon utilizando *Microsoft Excel®* (Office 2016). Las representaciones gráficas y las regresiones se elaboraron con el *Software OriginPro 9.0 64Bit* (Copyright© 1991-2013, *OriginLab Corporation*).

Los análisis de varianza (ANOVA) se llevaron a cabo con *Statgraphics Centurion XV 15.2.06* (*StatPoint Technologies*, Estados Unidos). Se utilizó el análisis de varianza unidireccional (*One-Way ANOVA*) con comparación múltiple de medias mediante la prueba de menor diferencia significativa de Fisher para evaluar el efecto de la variable estudiada sobre la respuesta obtenida, con un nivel de confianza del 95%. En los casos en que fue necesario estudiar el efecto de más de un factor sobre las respuestas obtenidas, se aplicó el análisis multifactorial de varianza (*Multifactor ANOVA*), utilizando la suma de cuadrados de tipo III, también con un nivel de confianza del 95%.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización bioquímica, funcional y cinética de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado libre

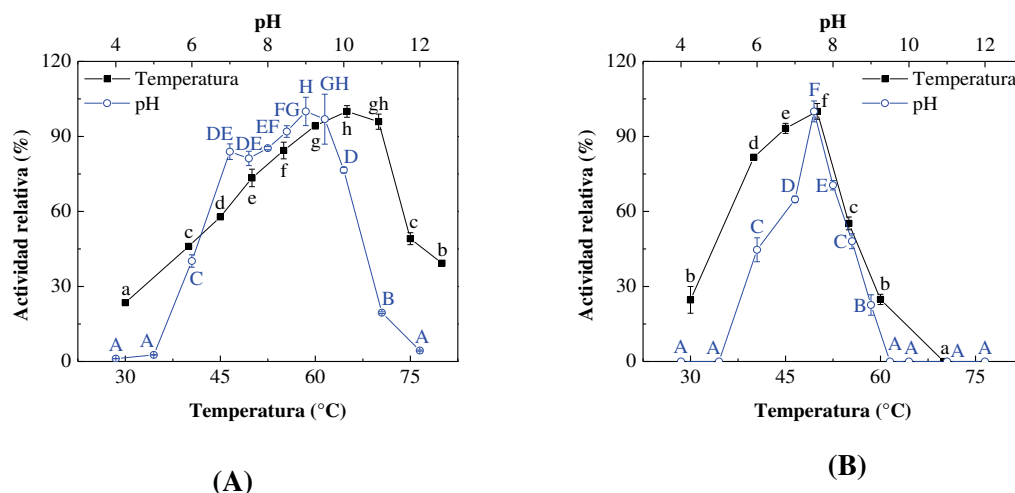
La síntesis de biocatalizadores insolubles requiere del conocimiento del comportamiento del catalizador en su estado libre. Por ello, es fundamental realizar una caracterización fisicoquímica y funcional exhaustiva de la actividad de las enzimas hidrolíticas, con el fin de poder comparar o identificar los cambios o alteraciones que puedan llegar a ocurrir como resultado de la inmovilización.

Para caracterizar las enzimas desde un punto de vista bioquímico, funcional y cinético, se realizaron ensayos bajo distintas condiciones de incubación y reacción. En la caracterización bioquímica, se evaluó la actividad enzimática a diversas temperaturas y valores de pH, además de estudiar el efecto de ciertos cationes metálicos sobre la actividad. La caracterización funcional se centró en pruebas de estabilidad térmica, estabilidad frente al pH y productividad. Finalmente, la caracterización cinética se llevó a cabo mediante variaciones en las concentraciones de enzima y sustrato.

#### 4.1.1. Estudios de temperatura y pH óptimos

La actividad relativa de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® a distintas temperaturas y valores de pH se muestra en la **Figura 17**, en donde es posible observar un incremento de la actividad de las enzimas, como consecuencia del aumento de la temperatura, hasta 65°C en el caso de *Alcalase*®, y hasta 50°C en el caso de *Flavourzyme*®. A partir de estas temperaturas, la actividad disminuye al continuar el aumento de la variable, llegando incluso a observarse actividad nula de *Flavourzyme*® a la temperatura más alta del rango estudiado (70°C). Este comportamiento es característico de las reacciones enzimáticas: el aumento de temperatura incrementa la velocidad de reacción hasta cierto punto y, luego, ocasiona la desnaturalización de la enzima, reduciéndose así la velocidad de reacción (Kumar et al., 2009). Por lo tanto, para los ensayos a distintos valores de pH se utilizó la temperatura a la cual las enzimas presentaron los valores más altos de actividad (100% de actividad relativa), es decir, 65°C para *Alcalase*® y 50°C para *Flavourzyme*®.

A diferencia de lo observado en los ensayos a distintas temperaturas, la actividad de las enzimas frente a diferentes valores de pH no presentó solamente un aumento o una reducción, sino también valores de actividad similares o nulos. En el caso de *Alcalase*®, no se presentaron diferencias significativas entre los pH 4 y 5, entre los pH 7, 7,5, 8 y 8,5 y entre los pH 9 y 9,5. Sin embargo, se observó un aumento de la actividad al incrementar el pH de 5 a 7 y de 8,5 a 9, seguido de una reducción desde el pH 9,5 hasta el pH 12. Por lo tanto, los valores más altos de actividad relativa para *Alcalase*® se observaron a pH 9 y 9,5.



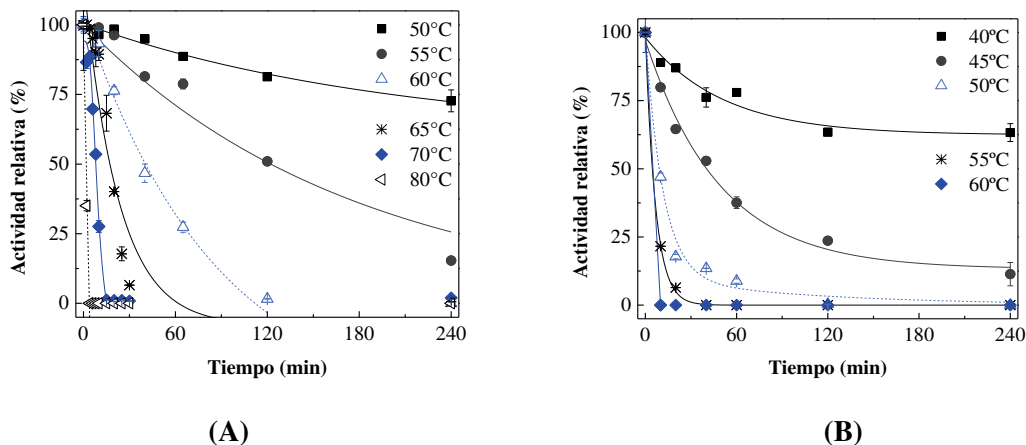
**Figura 17.** Actividad relativa de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado libre, evaluada a distintas temperaturas o valores de pH. Se tomó como 100% de actividad a la condición que arrojó el máximo para cada ensayo en cada condición. Resultados del ANOVA: letras minúsculas o mayúsculas diferentes, para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los resultados a distintas temperaturas o valores de pH, respectivamente.

En el caso de *Flavourzyme*®, la actividad fue nula en varias condiciones de pH evaluadas (pH 4, 5, 9,5, 10, 11 y 12) y se evidenciaron aumentos o disminuciones entre los pH 6 y 7,5 y entre los pH 7,5 y 9,5, respectivamente. Por ende, los mayores valores de actividad para esta enzima se registraron a pH 7,5. Este comportamiento depende de la estructura aminoacídica (y, por lo tanto, de su mecanismo de reacción) asociada de ciertos grupos ionizables presentes en las enzimas en las condiciones de pH evaluadas, los cuales usualmente están involucrados en los sitios activos. *Alcalase*®, como su nombre lo indica, es una proteasa bacteriana alcalina (Tacias-Pascacio et al., 2020) que destaca por su actividad y estabilidad a valores de pH alcalinos. Por su parte, *Flavourzyme*® es una mezcla de proteasas fúngicas que se caracteriza por hidrolizar sustratos en condiciones preferentemente neutras o ligeramente ácidas (Yust et al., 2007). A partir de estos resultados, se seleccionaron los pH 9 y 7,5 para los siguientes ensayos de caracterización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*®, respectivamente (los cuales corresponden al 100% de actividad relativa).

Se apreció una evidente consistencia entre los resultados obtenidos y la bibliografía analizada (Ferreira et al., 2003; Vafabakhsh et al., 2013; Wang et al., 2014; Merz et al., 2015a; Merz et al., 2015b; Liao & Huang, 2019; Magalhães et al., 2022), siendo las pequeñas diferencias observadas atribuibles a las particularidades de cada estudio de caracterización (tipo de sustrato usado, variante comercial de la enzima usada, tipo de ensayo de optimización, etc.).

4.1.2. Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH

La actividad de las enzimas pre-incubadas a distintas temperaturas y tiempos se muestra en la **Figura 18** (Tablas A4.1 y A4.2, Anexo 4).



**Figura 18.** Estabilidad frente a la temperatura de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado libre. El 100% de actividad enzimática se definió como la actividad de cada preparación al comienzo del ensayo (sin pre-incubación).

En términos generales, es posible observar que la actividad se reduce con el incremento de la temperatura y del tiempo de incubación, llegando incluso a valores nulos a las temperaturas más altas de los rangos evaluados. *Alcalase*® y *Flavourzyme*® mantuvieron valores considerables de actividad en el rango de 50-60°C y de 40-45°C, respectivamente; mientras que, los valores más bajos se presentaron entre 65 y 80°C, en el caso de *Alcalase*® y entre 50 y 60°C, en el caso de *Flavourzyme*®. A temperaturas elevadas, la actividad de ambas enzimas decayó rápidamente y se mantuvo constante hasta el momento final de la incubación o fue prácticamente nula.

Puntualmente, a 50°C *Alcalase*® mantuvo un  $72,70 \pm 3,92\%$  de la actividad inicial al tiempo final de incubación evaluado (240 min). A ese mismo tiempo y a 55°C, la actividad fue menor ( $15,34 \pm 0,89\%$ ). Para el resto de las temperaturas, la actividad relativa fue nula a los 240 min de pre-incubación. A 55°C y 120 min y, a 60°C y 40 min de pre-incubación, *Alcalase*® mostró valores de actividad cercanos al 50%; mientras que, a 65, 70 y 80°C este porcentaje se alcanzó a los 20 min, 10 min y antes de los 2 min de pre-incubación, respectivamente. A estas dos últimas temperaturas, se observó un comportamiento distinto a la inactivación exponencial simple decreciente. A 70°C, se evidenció una inactivación con período de gracia (regresión logística) entre 0 y 4 min, donde la actividad se mantuvo por encima del 86%, lo que sugiere que la enzima pudo haber sufrido cambios estructurales, aunque sin una pérdida significativa de la actividad. Esto fue seguido por una aceleración en la inactivación, de modo que, a partir de los 6

min, la actividad cayó por debajo del 70%. En el caso de 80°C, la inactivación fue rápida y de primer orden, registrándose un 35% de la actividad inicial a los 2 min de pre-incubación, por lo que se realizó un ajuste lineal para describir este comportamiento. En función de estos resultados, es posible indicar que *Alcalase*® presentó la mayor estabilidad a la temperatura más baja del rango evaluado (50°C). Esta temperatura difiere de la temperatura en la que la enzima mostró mayor actividad enzimática, es decir, donde evidenció los mayores rendimientos de hidrólisis de caseína (65°C).

En el caso de *Flavourzyme*®, es posible observar que a 40°C mantuvo un 63,27±3,26% de la actividad inicial al tiempo final de incubación evaluado (240 min). A ese mismo tiempo y a 45°C, la actividad fue menor (11,36±4,29%). Para el resto de las temperaturas, la actividad relativa fue nula a los 240 min de pre-incubación. A 45°C y 40 min y, a 50°C y 10 min, *Flavourzyme*® mostró valores de actividad cercanos al 50%; mientras que, a 55 y 60°C ese porcentaje se alcanzó antes de los 10 min de pre-incubación. Es importante mencionar que el comportamiento observado a 50°C requirió un ajuste de doble exponencial decreciente, lo que sugiere una inactivación bifásica. Esto indicaría la posible presencia de una fase inicial, en la que se agotan las formas enzimáticas más lábiles, seguida de una fase caracterizada por ser más lenta. Además, a 60°C, el comportamiento observado fue similar al de *Alcalase*® a 80°C: una inactivación rápida, con 0% de actividad remanente a los 10 min de pre-incubación, lo que justificó el uso de un ajuste lineal. A partir de estos resultados es posible concluir que, al igual que *Alcalase*®, la temperatura de mayor estabilidad para *Flavourzyme*® (40°C) difiere de la temperatura óptima para la hidrólisis de caseína (50°C).

Las conclusiones planteadas a partir de las actividades relativas obtenidas se reflejan en los parámetros de inactivación térmica presentados en la **Tabla 6**. Es posible observar que estos parámetros se vieron afectados por la temperatura. Por un lado, el aumento de esta variable ocasionó una reducción del tiempo de vida media y, por otro lado, provocó el efecto opuesto en los valores del coeficiente de inactivación. La reducción gradual del tiempo de vida media podría estar asociada a una desnaturalización irreversible de las enzimas (Silva et al., 2021). Mientras que, el incremento del  $k_1$  podría ser consecuencia de cambios en la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína, que conllevan luego a la desnaturalización (Bhunia et al., 2013). Por su parte, el parámetro  $\alpha_1$  fue nulo en la mayoría de las temperaturas evaluadas, excepto a 50°C, en el caso de *Alcalase*® y a 40 y 45°C, en el caso de *Flavourzyme*®. En concordancia con lo mencionado anteriormente, estos resultados indicarían que *Alcalase*® y *Flavourzyme*® presentan mayor estabilidad a la menor temperatura evaluada, es decir a 50°C y a 40°C, respectivamente. A estas temperaturas, las enzimas mostraron: **a)**- los mayores valores de tiempo de vida media, los cuales no pudieron ser estimados, indicando mayor termo-estabilidad o resistencia térmica a largos períodos de incubación, en comparación con las demás temperaturas evaluadas; **b)**- los

## Resultados y discusión

valores más bajos de coeficiente de inactivación ( $k_{1, Alcalase®} = 0,005 \pm 0,000 \text{ min}^{-1}$  y  $k_{1, Flavourzyme®} = 0,020 \pm 0,000 \text{ min}^{-1}$ ); y **c)** niveles de actividad a largo plazo distintos de cero ( $\alpha_{1, Alcalase®} = 59,92 \pm 12,43$  y  $\alpha_{1, Flavourzyme®} = 62,41 \pm 2,44$ ).

**Tabla 6.** Parámetros de inactivación térmica de *Alcalase®* (pH 9) y *Flavourzyme®* (pH 7,5) en estado libre, según el modelo de Sadana-Henley.

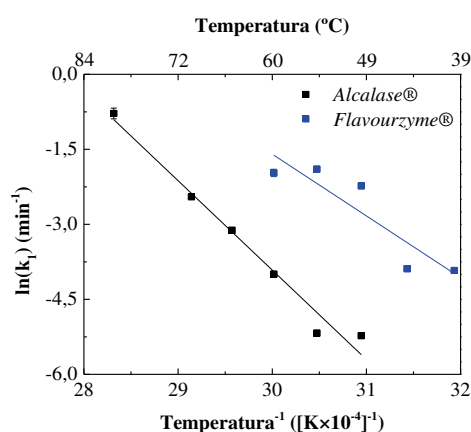
Enzima	Temperatura (°C)	$\alpha_1$	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
<i>Alcalase®</i>	50	59,92±12,43 <sup>b</sup>	0,005±0,000 <sup>a</sup>	NE
	55	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,006±0,000 <sup>a</sup>	122,21±3,46 <sup>c</sup>
	60	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,018±0,001 <sup>a</sup>	38,17±2,42 <sup>d</sup>
	65	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,044±0,002 <sup>ab</sup>	17,25±1,04 <sup>c</sup>
	70	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,086±0,001 <sup>b</sup>	8,03±0,06 <sup>b</sup>
	80	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,458±0,049 <sup>c</sup>	1,52±0,16 <sup>a</sup>
<i>Flavourzyme®</i>	40	62,41±2,44 <sup>c</sup>	0,020±0,000 <sup>a</sup>	NE
	45	13,22±3,66 <sup>b</sup>	0,020±0,001 <sup>a</sup>	40,30±1,26 <sup>c</sup>
	50	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,107±0,002 <sup>b</sup>	6,46±0,09 <sup>b</sup>
	55	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,150±0,000 <sup>c</sup>	4,61±0,05 <sup>a</sup>
	60	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,139±0,010 <sup>c</sup>	4,99±0,37 <sup>ab</sup>

Letras diferentes, para cada parámetro de inactivación y para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

NE: no estimado.

En la literatura se han reportado comportamientos similares (Madadlou et al., 2010; Chen et al., 2018) y diferentes (Tardioli et al., 2003; Yust et al., 2007; Madadlou et al., 2010; Valencia et al., 2011; Vafabakhsh et al., 2013; De Castro & Sato, 2015; Chen et al., 2018; da Silva & de Castro, 2018; Liao & Huang, 2019; Dos Santos Kimberle et al., 2020) a los obtenidos en este estudio, y dichas diferencias también se observan cuando se comparan los estudios entre sí. Estas diferencias podrían asociarse al uso de enzima dializada por parte de los autores, lo que lleva a que las enzimas se encuentren libres de estabilizadores (ácidos orgánicos, polioles, cationes, etc.) y de ciertos iones que incrementarían su estabilidad térmica. Otra posible causa de las discrepancias podría relacionarse al uso de una mezcla enzimática, como en el caso de Chen et al. (2018), donde la estabilidad sería el resultado de una interacción entre la estabilidad de *Alcalase®* y la estabilidad de tripsina.

Como se indicó en la metodología, también se realizó la gráfica de Arrhenius a partir de los resultados de estabilidad térmica (**Figura 19**), y se calcularon la energía de activación, la entalpía, la entropía y la energía libre (**Tabla 7**). Como se aprecia en la **Figura 19**, *Alcalase*® presentó una relación lineal entre el logaritmo natural de los coeficientes de inactivación y la inversa de las temperaturas absolutas, lo que refleja una reacción de desnaturalización simple de un solo paso. Sin embargo, *Flavourzyme*® no mostró este comportamiento. En la bibliografía también se han reportado casos de relaciones no lineales (Wang & Roberts, 2013). Algunos estudios evidenciaron una relación constituida por dos líneas rectas que se cruzan entre sí a una temperatura específica, la cual se ha asociado a cambios en los mecanismos de reacción o en el paso limitante de la velocidad. Otro comportamiento no lineal es el convexo, que puede ser cóncavo hacia arriba o cóncavo hacia abajo, y está relacionado con la agregación enzimática. Además, se han informado relaciones en *zig-zag*, que se atribuyen a la presencia de dos o más formas nativas, una a baja temperatura y otra a alta temperatura (Levitsky et al., 1994). Este último comportamiento fue el que más se asemejó al de *Flavourzyme*® (**Figura 20**). En la literatura se han reportado casos de dependencia de tipo *zig-zag* en la enzima  $\alpha$ -quimotripsina y en la butirilcolinesterasa plasmática humana. Levitsky et al. (1994) explicaron que este tipo de dependencia es común en la inactivación de enzimas. En estos casos, la inactivación no es una simple transición irreversible entre dos estados o un proceso de dos etapas iniciado por una desnaturalización reversible. Incluso, es posible que se presenten valores negativos de energía de inactivación debido a fenómenos como autólisis, agregación o procesos bimoleculares. Por lo tanto, al análisis de los datos de *Flavourzyme*® se sumó la regresión en tramos (**Figura 20**) y se calcularon las energías de activación, las entalpías, las entropías y las energías libres de Gibbs para cada uno de ellos (**Tabla 8**).



**Figura 19.** Gráfica de Arrhenius de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado libre.

A partir de la regresión lineal de los datos de ambas enzimas, se registraron valores positivos tanto de entalpía como de entropía y energía libre de desnaturalización. Teniendo en

cuenta que la entalpía se define como el calor necesario para desnaturalizar una enzima, valores altos y positivos se asocian a una enzima estable (Bhunia et al., 2013). En este caso, tanto *Alcalase*® como *Flavourzyme*® registraron valores altos y positivos de entalpía, lo que indica una gran estabilidad de las enzimas, a las cuales se les debe entregar una energía igual o mayor a estos valores para promover su desnaturalización. Estos valores promedio se encontrarían en valores cercanos a 146 y 100 kJ/mol, respectivamente. Sin embargo, es importante tener presente que la estabilidad térmica no depende únicamente de la entalpía, sino de un equilibrio entre entalpía y entropía.

**Tabla 7.** Parámetros de inactivación térmica de *Alcalase*® (pH 9) y *Flavourzyme*® (pH 7,5) en estado libre, según el modelo de Arrhenius.

Enzima	Temperatura (°C)	$\Delta H$ (kJ/mol)*	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol·K)*
<i>Alcalase</i> ®	50	145,95±1,59	73,35±0,11 <sup>e</sup>	224,65±4,60
	55	145,91±1,59	74,31±0,09 <sup>f</sup>	218,20±4,58
	60	145,87±1,59	72,13±0,08 <sup>d</sup>	221,32±4,53
	65	145,83±1,59	70,71±0,12 <sup>c</sup>	222,15±4,35
	70	145,78±1,59	69,80±0,02 <sup>b</sup>	221,43±4,58
	80	145,70±1,59	66,86±0,32 <sup>a</sup>	223,26±3,61
<i>Flavourzyme</i> ®	40	100,07±1,33	67,77±0,03 <sup>c</sup>	103,14±4,36
	45	100,03±1,33	68,72±0,13 <sup>d</sup>	98,42±4,59
	50	99,99±1,33	65,31±0,04 <sup>a</sup>	107,32±4,01
	55	99,95±1,33	65,36±0,00 <sup>a</sup>	105,41±4,07
	60	99,91±1,33	66,52±0,21 <sup>b</sup>	100,20±3,39

Letras diferentes, para cada parámetro de inactivación y para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\* La ausencia de letras, dentro de una misma columna y para cada enzima, indica que no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Energía de activación para la inactivación térmica: 148,64±1,59 kJ/mol para *Alcalase*® y 102,68±1,33 kJ/mol para *Flavourzyme*®.

Por su parte, la entropía de inactivación constituye la energía por grado necesaria para que una enzima pase de su estado nativo a un estado desnaturalizado. Valores positivos o negativos de entropía indican un aumento o una disminución de la aleatoriedad (o desorden), respectivamente, como consecuencia de la desnaturalización. En general, valores entrópicos

positivos se asocian con la desnaturalización, por lo que grandes cambios en la entropía suelen estar relacionados a una enzima menos estable (Bhunia et al., 2013). Tanto *Alcalase*® como *Flavourzyme*® registraron valores positivos de entropía de 222 y 103 J/mol·K, respectivamente, lo que indica un aumento de la aleatoriedad como consecuencia de la desnaturalización. A su vez, es posible apreciar que no se presentaron grandes cambios entrópicos al no registrarse diferencias significativas entre los valores obtenidos a las temperaturas evaluadas. Estos resultados sugieren la posible presencia de un desplegamiento enzimático y un comportamiento estable de las enzimas.

En relación a la energía libre de Gibbs, esta abarca las contribuciones tanto de la entalpía como de la entropía. Valores negativos o bajos se asocian con la espontaneidad de la desnaturalización, es decir, la enzima se desnaturalizaría fácilmente (Bhunia et al., 2013). En los resultados obtenidos, las enzimas mostraron valores positivos de energía libre, de 67 a 74 kJ/mol en el caso de *Alcalase*® y de 65 a 69 kJ/mol en el caso de *Flavourzyme*®. Estos valores reflejan que la desnaturalización no es espontánea, es decir, se requiere de una fuerza externa (como el aumento de la temperatura) para que ocurra. Estos resultados podrían indicar una estabilidad natural de las enzimas a las temperaturas evaluadas. Sin embargo, se observa una disminución significativa de la energía libre como consecuencia del aumento de la temperatura, lo que sugiere que la desnaturalización se vuelve más favorable a temperaturas más altas, algo esperable en procesos térmicos de inactivación enzimática.

En cuanto a la energía de inactivación térmica, se obtuvo un valor de  $148,64 \pm 1,59$  kJ/mol para *Alcalase*® y de  $102,68 \pm 1,33$  kJ/mol para *Flavourzyme*®. Teniendo en cuenta que la energía de activación para la inactivación enzimática es un criterio clave para evaluar la estabilidad térmica de las proteínas, ya que, a mayor energía de desnaturalización, mayor es la estabilidad de la enzima (Abdel-Naby et al., 2017), la mayor  $E_a$  registrada para *Alcalase*® sugiere una mayor resistencia a la desnaturalización térmica en comparación con *Flavourzyme*®. Esto indicaría que *Alcalase*® es más estable a las temperaturas evaluadas.

Resultados similares fueron informados por otros autores (Hernández-Martínez et al., 2011; Gohel & Singh, 2012; Bhunia et al., 2013; Abdel-Naby et al., 2017; Wahba, 2022); no obstante, también se han reportado valores negativos de entropía (Hernández-Martínez et al., 2011; Gohel & Singh, 2012; Bhunia et al., 2013), lo cual indica que la desnaturalización no sólo está asociada a un aumento del desorden, sino que también podría involucrar fenómenos de compactación o agregación de la enzima parcialmente desplegada (Ortega et al., 2004; Bhunia et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, el análisis de los datos de *Flavourzyme*® también involucró la regresión por tramos (**Figura 20 y Tabla 8**).

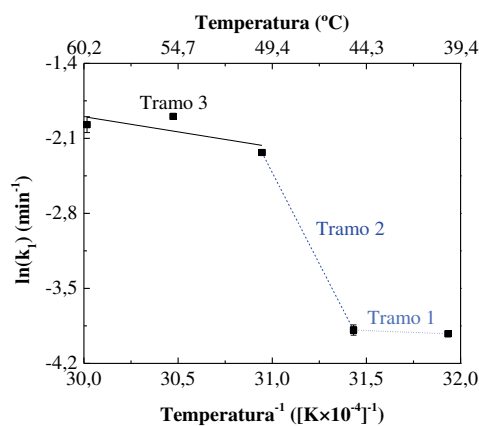


Figura 20. Gráfica de Arrhenius de *Flavourzyme*® en estado libre, evaluada en tramos.

Tabla 8. Parámetros de inactivación térmica de *Flavourzyme*® (pH 7,5), según el modelo de Arrhenius, evaluada en tramos.

Tramo	Temperatura (°C)	$\Delta H$ (kJ/mol)*	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol·K)*
1	40	3,25±6,04	57,11±0,03 <sup>a</sup>	-171,99±19,38
	45	3,21±6,04	57,89±0,13 <sup>b</sup>	-171,86±19,38
2	45	280,45±5,77	57,89±0,13 <sup>b</sup>	699,54±17,73
	50	280,41±5,77	54,31±0,04 <sup>a</sup>	699,67±17,96
3	50	20,82±5,32	54,31±0,04 <sup>a</sup>	-103,63±16,33
	55	20,78±5,32	54,19±0,00 <sup>a</sup>	-101,81±16,21
	60	20,74±5,32	55,18±0,21 <sup>b</sup>	-103,39±15,34

Letras diferentes, dentro de una misma columna para cada tramo, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

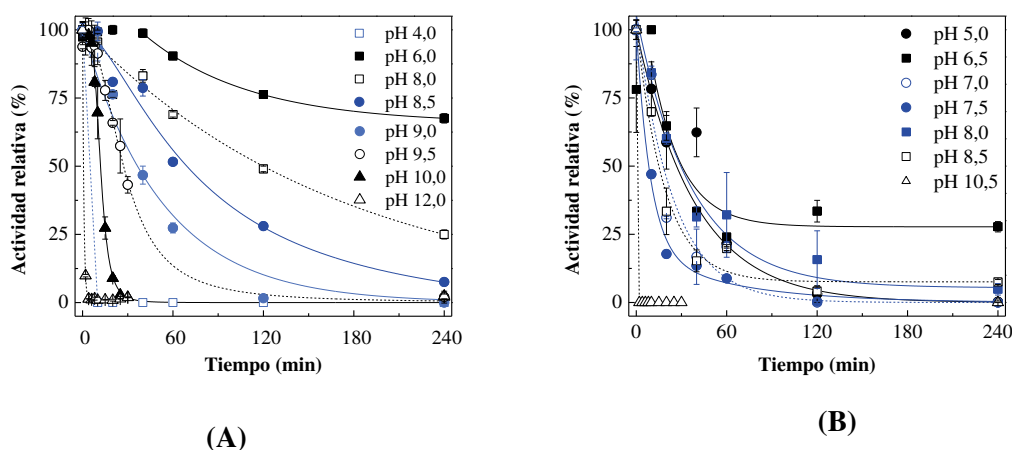
\* La ausencia de letras, dentro de una misma columna para cada tramo, indica que no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Energía de activación para la inactivación térmica: 40-45°C = 5,86±6,04 kJ/mol, 45-50°C = 283,09±5,77 kJ/mol, 50-60°C = 23,51±5,32 kJ/mol.

Al igual que *Alcalase*®, *Flavourzyme*® mostró una gran estabilidad a las temperaturas evaluadas, con valores positivos tanto de entalpía como de energía libre de Gibbs. Sin embargo, los valores de entropía resultaron negativos en los tramos 1 y 3, lo que podrían estar relacionados con la conservación parcial de la estructura enzimática. En el tramo 1, la temperatura podría no ser suficiente para inducir un despliegue significativo de la enzima, mientras que en el tramo 3, la desnaturalización podría estar acompañada de interacciones que limitan el aumento del desorden molecular y favorezcan la agregación enzimática, como se mencionó anteriormente.

Este comportamiento presentado por *Flavourzyme*® podría estar relacionado con el hecho de que la preparación comercial es una mezcla de proteasas (Merz et al., 2015b), lo que hace que el efecto de la temperatura varíe en cada una de ellas. Además, la interacción entre las enzimas podría afectar su respuesta a la temperatura, generando efectos protectivos de estabilización y/o pseudo-desestabilización que expliquen el comportamiento no lineal observado en *Flavourzyme*®.

La actividad de las enzimas pre-incubadas a distintos valores de pH y tiempos se muestra en la **Figura 21** (Tablas A4.3 y A4.4, Anexo 4). En términos generales, es posible observar que la actividad de las enzimas se redujo con el incremento del tiempo de incubación, presentándose algunas excepciones; y, el cambio de pH ocasionó diferentes respuestas. Por un lado, los valores más altos de actividad se obtuvieron entre los pH 6 y 8,5, en el caso de *Alcalase*®, y a pH 6,5 y 8, en el caso de *Flavourzyme*®. Por otro lado, los valores más bajos de se presentaron a pH 4 y 12, en el caso de *Alcalase*®, y a pH 10,5, en el caso de *Flavourzyme*®. Estos valores de pH resultaron ser condiciones adversas para la estabilidad de las enzimas.



**Figura 21.** Estabilidad frente al pH de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado libre. El 100% de actividad enzimática se definió como la actividad de cada preparación al comienzo del ensayo (sin pre-incubación). Los valores de actividad relativa a 240 min para pH 4-9 en *Alcalase*® y pH 5-8,5 en *Flavourzyme*® se estimaron a partir de los datos proporcionados por las regresiones.

Al tiempo máximo de incubación ensayado (120 min), *Alcalase*® retuvo un  $76,27 \pm 0,32\%$ , un  $49,01 \pm 1,03\%$  y un  $28,05 \pm 0,14\%$  de actividad a pH 6, 8 y 8,5, respectivamente. Sin embargo, a pH 9 y 9,5, la actividad residual registrada fue inferior al 2%. Es importante mencionar que a pH 6, *Alcalase*® mostró un comportamiento característico de inactivación con período de activación, donde la actividad aumentó de un 97% a un 100% entre 0 y 20 min, para luego decaer al valor indicado. Como se mencionó en la **sección 3.2.3.1**, este tipo de comportamiento está asociado con una distribución inicial de formas enzimáticas.

A pH 8,5, 9,5 y 10, el comportamiento observado también fue distinto al de la exponencial simple decreciente: la actividad se mantuvo sin diferencias significativas en los primeros tiempos de incubación, para luego decaer, lo que sugiere una inactivación con periodo de gracia (ajuste logístico). De forma similar, de Souza et al. (2009) reportaron un fenómeno comparable al estudiar la enzima transglutaminasa de *Bacillus circulans* BL32, donde se observó una fase inicial lenta en la inactivación, seguida por una aceleración en la tasa de pérdida de actividad, característica del llamado período de gracia. Este comportamiento, explicado por el modelo de Lumry-Eyring, se asocia a una reacción reversible predominante en la etapa inicial del proceso (de Souza et al., 2009). Además, según Tomazic & Klivanov (1988), este fenómeno podría deberse a un desplegamiento parcial de la enzima al superar cierto umbral térmico, lo que genera una pérdida de actividad reversible a corto plazo, pero irreversible tras exposiciones más prolongadas (de Souza et al., 2009). Esta interpretación aporta una posible explicación estructural al comportamiento no lineal detectado. Por su parte, a pH 4, el comportamiento observado fue diferente: una inactivación rápida, que resultó en actividad nula a los 10 min de pre-incubación (ajuste lineal).

En cuanto a *Flavourzyme*®, al tiempo máximo de incubación ensayado (120 min), retuvo un 33,47±3,98% y un 15,72±10,58% de la actividad inicial a pH 6,5 y 8, respectivamente, y entre un 0% y un 4% en los demás valores de pH estudiados. Con esta enzima, se observó un comportamiento de inactivación bifásica a pH 7,5 que requirió un ajuste de doble exponencial decreciente. Esto sugiere la posible presencia de una fase inicial en la que se agotan las formas enzimáticas lábiles, seguida de una fase más lenta. Además, a pH 10,5, al igual que a pH 4 con *Alcalase*®, *Flavourzyme*® se inactivó rápidamente a los 10 min de pre-incubación (ajuste lineal).

Los parámetros de inactivación frente al pH se presentan en la **Tabla 9**, donde es posible observar que el parámetro  $\alpha_1$  tomó valores considerables y diferentes de cero a pH 6 en el caso de *Alcalase*®, y a pH 6,5 en el caso de *Flavourzyme*®. En cuanto al coeficiente de inactivación, éste alcanzó los valores más altos a pH alcalinos, mientras que, el tiempo de vida media lo hizo a un rango de pH cercano a la neutralidad. En función de estos resultados, es posible observar que *Alcalase*® presenta una mayor estabilidad entre los valores de pH 6 y 8,5, donde se alcanzaron los valores máximos de  $t_{1/2}$  (no estimado a pH 6, 119,96±5,80 min a pH 8 y 69,37±2,41 min a pH 8,5) y los valores más bajos de  $k_1$  (0,014±0,002 min<sup>-1</sup> a pH 6, 0,006±0,000 min<sup>-1</sup> a pH 8 y 0,010±0,000 min<sup>-1</sup> a pH 8,5). En el caso de *Flavourzyme*®, la mayor estabilidad se demostró a pH 5, 6,5 y 8, donde se registraron los valores más altos de  $t_{1/2}$  (26,75±6,03 min a pH 5, 30,30±2,10 min a pH 6,5 y 30,42±6,91 min a pH 8) y los valores más bajos de  $k_1$  (0,027±0,006 min<sup>-1</sup> a pH 5, 0,050±0,000 min<sup>-1</sup> a pH 6,5 y 0,027±0,005 min<sup>-1</sup> a pH 8).

## Resultados y discusión

**Tabla 9.** Parámetros de inactivación frente al pH de *Alcalase*® (60°C) y *Flavourzyme*® (50°C) en estado libre, según el modelo de Sadana-Henley.

Enzima	pH	$\alpha_1$	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
<i>Alcalase</i> ®	4,0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,139±0,002 <sup>d</sup>	5,00±0,06 <sup>a</sup>
	6,0	65,49±2,72 <sup>b</sup>	0,014±0,002 <sup>a</sup>	NE
	8,0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,006±0,000 <sup>a</sup>	119,96±5,80 <sup>f</sup>
	8,5	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,010±0,000 <sup>ab</sup>	69,37±2,41 <sup>e</sup>
	9,0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,018±0,001 <sup>ab</sup>	38,17±2,42 <sup>d</sup>
	9,5	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,026±0,002 <sup>b</sup>	27,23±2,28 <sup>c</sup>
	10,0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,058±0,004 <sup>c</sup>	11,90±0,74 <sup>b</sup>
	12,0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,152±0,022 <sup>c</sup>	0,60±0,01 <sup>a</sup>
<i>Flavourzyme</i> ®	5,0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,027±0,006 <sup>a</sup>	26,75±6,03 <sup>d</sup>
	6,5	27,74±2,41 <sup>d</sup>	0,050±0,000 <sup>a</sup>	30,30±2,10 <sup>d</sup>
	7,0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,041±0,001 <sup>a</sup>	17,83±2,24 <sup>c</sup>
	7,5	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,107±0,002 <sup>b</sup>	6,46±0,09 <sup>ab</sup>
	8,0	4,62±0,48 <sup>b</sup>	0,027±0,005 <sup>a</sup>	30,42±6,91 <sup>d</sup>
	8,5	7,52±0,91 <sup>c</sup>	0,054±0,006 <sup>ab</sup>	15,03±2,34 <sup>bc</sup>
	10,5	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,699±0,062 <sup>c</sup>	1,00±0,09 <sup>a</sup>

Letras diferentes, para cada parámetro de inactivación y para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

NE: no estimado.

Si bien no se encontraron estudios previos similares, los resultados obtenidos se compararon con datos de estabilidad reportados en la bibliografía para valores de pH similares (Yust et al., 2007; Valencia et al., 2011; da Silva & de Castro, 2018; Liao & Huang, 2019; dos Santos Kimberle et al., 2020), lo que sugiere que los estudios realizados constituyen un aporte relevante para la caracterización de las enzimas. La comparación de los resultados con la bibliografía reveló una mayor estabilidad en algunos casos y una menor estabilidad en otros. Como se mencionó con anterioridad, el uso de la enzima dializada, las diferentes concentraciones de enzima, así como la concentración y el tipo de sustrato y la temperatura de incubación, podrían ser algunas de las razones de las discrepancias observadas entre los resultados informados.

Estos resultados sobre la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH resaltan la importancia de comprender el comportamiento específico de las enzimas con las que se trabaja,

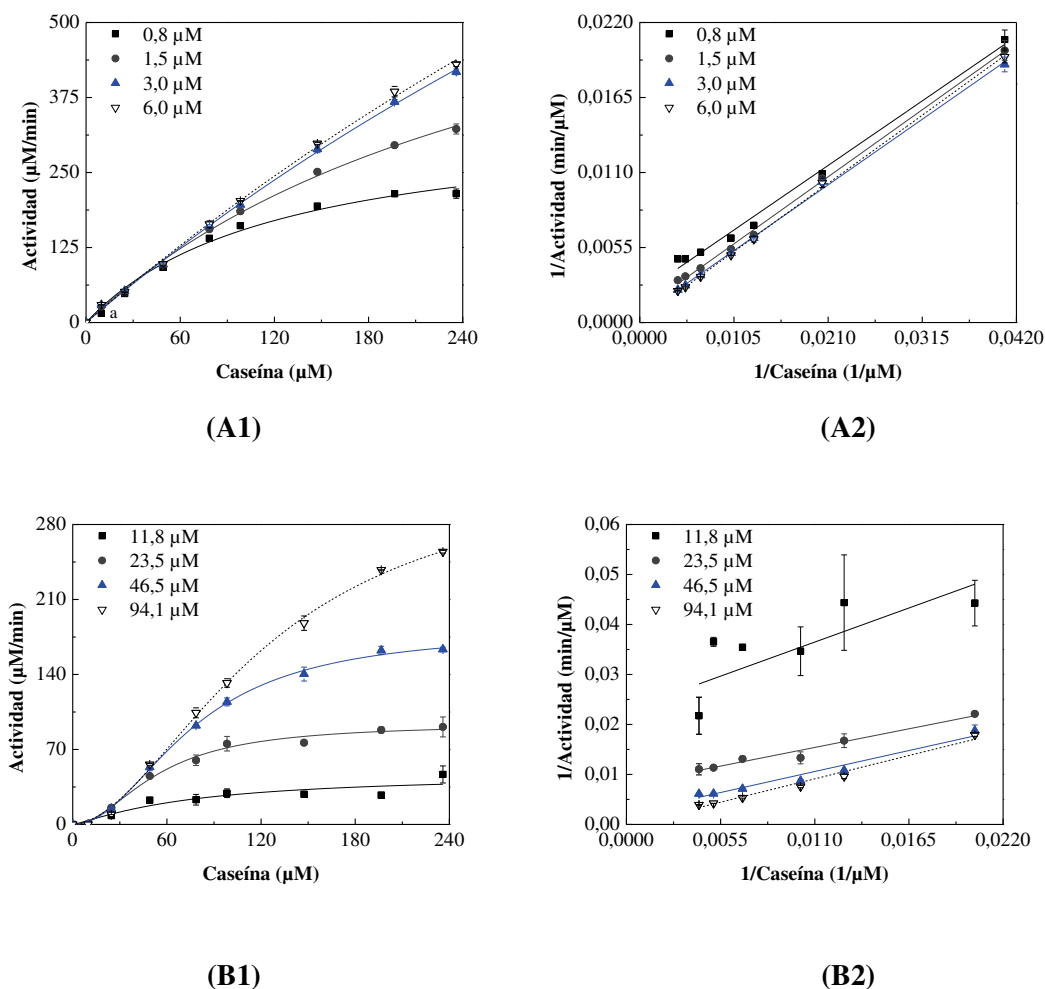
ya que, al comparar los datos obtenidos con otros estudios y entre éstos, se evidencian diferencias notables. A su vez, el conocimiento detallado de la estabilidad de las enzimas permite anticipar su rendimiento frente a determinadas condiciones potenciales de escalado de procesos hidrolíticos para su aplicación a escala piloto o industrial, lo que contribuye indudablemente a la definición de parámetros óptimos para su aplicación. Además, la falta de estudios sobre la estabilidad enzimática frente a diferentes condiciones de pH resalta la relevancia de los resultados obtenidos en este trabajo. Estos resultados aportan información valiosa sobre posibles fenómenos de inactivación, observándose comportamientos complejos como la inactivación bifásica, donde la curva de inactivación se divide en dos fases: una fase inicial rápida asociada al agotamiento de la forma enzimática más lábil, y una segunda fase más lenta (Polakovič & Vrabel, 1996). También se pudo observar la inactivación con período de gracia, donde existe una fase inicial más lenta en la que la enzima experimenta cambios sin pérdida de actividad, sugiriendo posibles reacciones reversibles, seguida de una aceleración de la inactivación (Polakovič & Vrabel, 1996; Tomazic & Klibanov, 1988; de Souza et al., 2009). Además, se evidenció el fenómeno de inactivación con período de activación, donde se observa un aumento inicial de la actividad hasta alcanzar un máximo, lo que sugiere la presencia de varias formas enzimáticas, seguido de una posterior disminución de la actividad (Polakovič & Vrabel, 1996). Estos fenómenos pueden ofrecer una visión más clara sobre la reversibilidad de la inactivación y la naturaleza de la estabilidad enzimática frente a variaciones en el pH.

#### **4.1.3. Estudios cinéticos**

La actividad de las enzimas evaluada utilizando distintas concentraciones de sustrato y de enzima, así como los parámetros cinéticos estimados a partir de dichos resultados, se presentan en la **Figura 22 (Tablas A4.5 y A4.6, Anexo 4)** y en la **Tabla 10**, respectivamente.

Como es de esperar, el aumento en la concentración de sustrato y de enzima produjo un incremento en la actividad enzimática. En cuanto a los parámetros cinéticos, estos mostraron que, a mayor concentración de enzima, mayor fue la velocidad de reacción (generación de productos) en un mismo tiempo de ensayo. El aumento de  $V_{max}$  está asociado a su dependencia directa con la concentración enzimática, dado que un mayor número de sitios activos disponibles permite una mayor velocidad de reacción. Mientras que, el incremento de  $k_{0,5}$  refleja una menor afinidad de la enzima por el sustrato (da Silva & de Castro, 2018), lo que podría estar asociado a la presencia de una inhibición por producto. Tal como se observa en las **Figuras 22.A2 y B2**, tanto en *Alcalase*® como en *Flavourzyme*®, se evidencia un patrón compatible con una inhibición acompetitiva: las rectas son paralelas entre sí, presentan pendientes iguales y diferentes ordenadas al origen. En cuanto al parámetro  $n$  en el caso de *Flavourzyme*®, se observa que tomó valores superiores a 1, lo que indica una cooperatividad positiva. Esto sugiere que la unión inicial del

sustrato a la enzima aumenta la afinidad de los sitios activos restantes, favoreciendo la interacción enzimática con el sustrato. Asimismo, este valor podría estar asociado a un mayor número de sitios de unión, posiblemente como resultado del desdoblamiento de las distintas estructuras enzimáticas presentes en la preparación comercial de *Flavourzyme*®.



**Figura 22.** Comportamiento de la actividad enzimática de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado libre, frente a distintas concentraciones de sustrato y enzima. (1) Ajuste de las curvas según los modelos de Michaelis-Menten (para *Alcalase*®) y de Hill (para *Flavourzyme*®). (2) Representación lineal mediante la inversión de los ejes (doble recíproco).

Algunos parámetros cinéticos reportados en la bibliografía, como los de Mannheim & Cheryan (1990) y Wang et al. (2014) para la hidrólisis de caseína con *Alcalase*®, se encontraron dentro del rango obtenido en este estudio. Sin embargo, otros difirieron como los reportados por Ferreira et al. (2003), Colleary & Ó Fágáin (2008) y Liao & Huang (2019), tanto para *Alcalase*® como para *Flavourzyme*®. Las diferencias pueden asociarse al uso de otras condiciones de reacción o concentraciones de enzima, como así también a la presencia del algún efecto del producto sobre las enzimas. En la bibliografía también se reportaron casos de inhibición por

producto, como es el de Merz et al. (2015c), quienes estudiaron la cinética de *Flavourzyme* durante la hidrólisis de gluten de trigo. Estos autores indicaron que la inhibición por producto ya se había observado previamente para la enzima cruda. Sin embargo, destacaron que una información confiable sobre la cinética enzimática solo puede obtenerse mediante el uso de enzimas aisladas de *Flavourzyme* para su caracterización. Durante sus estudios, observaron que distintos inhibidores, incluyendo el hidrolizado de gluten de trigo, causaban inhibición. En cuanto al grado de hidrólisis, encontraron que este disminuía a medida que aumentaba la concentración de sustrato, lo que relacionaron con la inhibición por producto. Este comportamiento fue especialmente evidente en las exopeptidasas, las cuales mostraron una inhibición más pronunciada que las endopeptidasas.

**Tabla 10.** Parámetros cinéticos de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado libre.

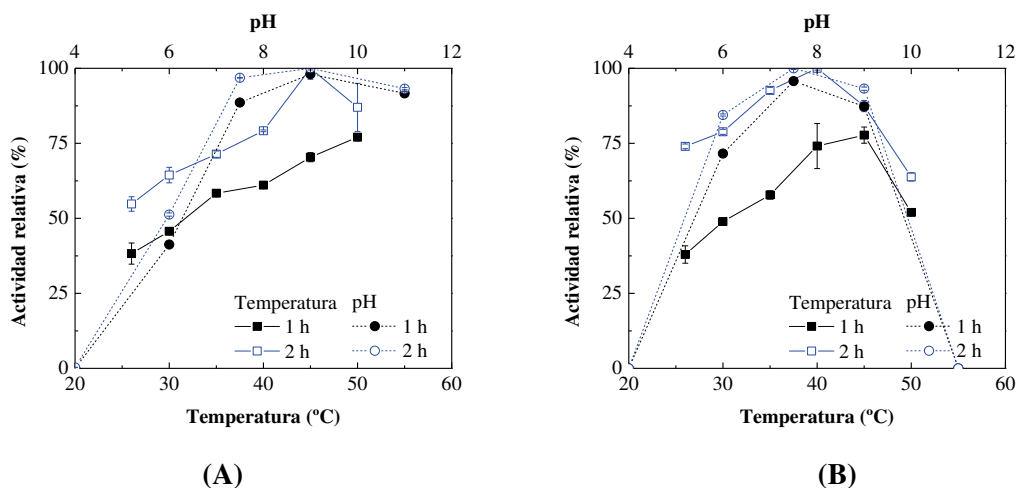
Enzima	Concentración (µM)	V <sub>max</sub> (µM/min)	K <sub>0,5</sub> (µM)	n
<i>Alcalase</i> ®	0,8	343,35±13,71 <sup>a</sup>	122,43±5,32 <sup>a</sup>	-
	1,5	756,00±19,93 <sup>b</sup>	308,55±4,98 <sup>b</sup>	-
	3,0	2171,98±27,40 <sup>c</sup>	978,47±29,20 <sup>c</sup>	-
	6,0	2474,93±93,19 <sup>d</sup>	1097,64±65,31 <sup>d</sup>	-
<i>Flavourzyme</i> ®	11,8	28,51±0,76 <sup>a</sup>	32,51±2,56 <sup>a</sup>	3,44±0,55 <sup>b</sup>
	23,5	93,62±5,67 <sup>b</sup>	54,04±1,14 <sup>b</sup>	1,96±0,02 <sup>a</sup>
	46,5	181,01±3,13 <sup>c</sup>	76,54±0,83 <sup>c</sup>	2,06±0,03 <sup>a</sup>
	94,1	333,88±12,95 <sup>d</sup>	123,85±9,39 <sup>d</sup>	1,83±0,05 <sup>a</sup>

Letras diferentes, dentro de cada columna para cada enzima, indican diferencias significativas (p<0,05).

En cuanto al comportamiento observado en la constante de Michaelis-Menten, Yassin et al. (2024) proponen una nueva perspectiva sobre la misma, al sugerir que puede verse modulada por la concentración de enzima. Esta propuesta contradice la visión tradicional que sostiene que K<sub>m</sub> es independiente de la concentración enzimática, es decir, que representa una constante específica del sistema enzima-sustrato, reflejando su afinidad y manteniéndose invariable ante cambios en la cantidad de enzima. Según los autores, al aumentar la concentración de enzima, se intensifican las fuerzas repulsivas entre las propias moléculas de enzimas, lo que dificulta la interacción con el sustrato y, por ende, modifica el valor de K<sub>m</sub>.

4.1.4. Estudios de productividad

La productividad de las enzimas evaluada a distintas temperaturas, valores de pH y tiempos de reacción se presenta en la **Figura 23** (Tablas A4.7 y A4.8, Anexo 4).



**Figura 23.** Productividad de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado libre, evaluada a distintas temperaturas, valores de pH y tiempos de reacción.

A partir de los resultados obtenidos, es posible observar que el incremento de la temperatura de reacción condujo a un aumento de la actividad de las enzimas. Sin embargo, se presentaron reducciones de la actividad hacia el extremo superior del rango de temperaturas ensayado. En cuanto al pH de reacción, se aprecia una relación directamente proporcional entre el pH y la actividad hasta el pH de mayor rendimiento de hidrólisis para cada enzima (pH 9 para *Alcalase*® y pH 7,5 para *Flavourzyme*®), resultando ser condiciones desfavorables los valores de pH extremos. Estos efectos de la temperatura y el pH sobre la actividad de las enzimas son similares a los observados en los ensayos de caracterización mencionados en la **sección 4.1.1**. La temperatura favorece las reacciones hasta cierto punto (valores cercanos a su temperatura óptima), a partir del cual se induce la desnaturalización progresiva de las enzimas. Por su parte, el pH juega su rol a través de la ionización de grupos involucrados en el sitio activo del catalizador. A su vez, los resultados muestran que, para una misma temperatura o valor de pH de reacción, el aumento del tiempo de hidrólisis conduce a un incremento de la actividad. Este comportamiento observado indicaría que el uso de pH óptimos y temperaturas cercanas a 50°C, en el caso de *Alcalase*®, o a 40°C, en el caso de *Flavourzyme*®, serían más adecuados para procesos hidrolíticos en los que se busquen altos grados de hidrólisis, es decir, en reacciones de larga duración.

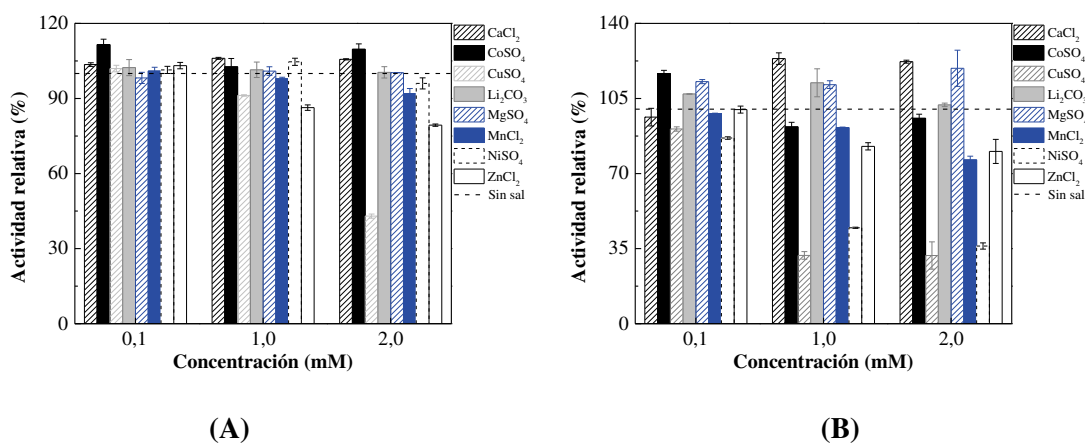
Aunque no se encontraron estudios previos efectuados en condiciones equivalentes o similares, los resultados obtenidos se compararon con datos de hidrólisis en el tiempo, reportados

en la bibliografía. Esto sugiere que los estudios realizados constituyen un aporte relevante para la caracterización de este tipo de enzimas hidrolíticas.

Kumar et al. (2016), Liang et al. (2021) y Mudgil et al. (2022) trabajaron con distintos sustratos y enzimas en condiciones óptimas para cada una y también observaron un incremento significativo del grado de hidrólisis conforme aumentaba el tiempo de incubación. Sin embargo, los autores reportaron, en algunos casos, una desaceleración en la velocidad de hidrólisis a partir de cierto tiempo, probablemente debido a efectos desnaturizantes. Kumar et al. (2016) atribuyeron este fenómeno a la disminución de la disponibilidad de enlaces peptídicos escindibles en el sustrato, aunque también podría estar relacionado con un posible efecto inhibitorio de los productos generados durante la hidrólisis, tal como se mencionará en la **sección 4.2.1** (Martínez-Montaña et al., 2022).

#### 4.1.5. Efecto de la adición de iones metálicos sobre la actividad enzimática

La actividad de las enzimas evaluada en presencia de distintos iones metálicos se presenta en la **Figura 24** (Tablas A4.9 y A4.10, Anexo 4), donde es posible observar que algunos iones metálicos actuaron como inhibidores, otros como activadores e incluso algunos presentaron ambos efectos dependiendo de la concentración empleada. En otros casos, no se evidenció ningún efecto significativo.



**Figura 24.** Actividad relativa de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado libre, evaluada en presencia de distintas concentraciones de sales.

En el caso de *Alcalase*®, la presencia de calcio y cobalto en las tres concentraciones evaluadas, así como litio a 0,1 mM, incrementaron la actividad enzimática. En cambio, la presencia de cobre y manganeso a 1 y 2 mM causó un efecto inhibitorio. Los iones metálicos que presentaron ambos efectos fueron níquel y zinc, mientras que el magnesio no tuvo ningún efecto sobre la actividad de *Alcalase*®.

Por su parte, en el caso de *Flavourzyme*®, la actividad enzimática aumentó con la presencia de calcio a 1 y 2 mM, litio a 0,1 y 1 mM y magnesio en las tres concentraciones. Sin embargo, la presencia de cobre y níquel en las tres concentraciones, así como de manganeso y zinc a 1 y 2 mM, redujo la actividad enzimática. El ión metálico que presentó ambos efectos fue el cobalto. A diferencia de *Alcalase*®, todos los iones metálicos evaluados ejercieron algún efecto, ya sea inhibidor, activador o ambos sobre *Flavourzyme*®.

Los resultados obtenidos se compararon con los datos disponibles en la bibliografía sobre la relación entre iones metálicos y enzimas. En este sentido, Lv et al. (2021) evaluaron la actividad residual de la quitinasa GH19 de *Streptomyces alfae* en presencia de diferentes iones metálicos y reportaron también efectos activadores por parte del cobalto, calcio y magnesio, y efectos inhibidores del cobre y del níquel. De manera similar, Mechri et al. (2017), al purificar y caracterizar una proteasa de la cepa VP3 de *Aeribacillus pallidus*, indicaron que las proteasas alcalinas requieren un catión divalente como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , o una combinación de estos, para alcanzar su máxima actividad. En concordancia, Sayem et al. (2006) al evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de una proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* MZK03 en presencia de calcio, magnesio y manganeso, registraron un incremento de la actividad, lo que destaca la importancia de estos iones metálicos como cofactores. En particular, se sabe que las serina-proteasas contienen dos sitios de unión de calcio (Mechri et al., 2017), lo que coincide con los resultados obtenidos con *Alcalase*® en presencia de este catión. En contraposición, el efecto del magnesio y el manganeso reportado por los autores difiere de los informados. Es de relevancia destacar que las enzimas no se dializaron o ultrafiltraron previamente con el objetivo de eliminar cualquier ion o estabilizante que pueda estar presente en las preparaciones comerciales utilizadas. Por esta razón, los resultados obtenidos pueden diferir sensiblemente de los reportados por otros autores.

Por su parte, Sattar et al. (2017) incubaron una proteasa de *Aspergillus niger* KIBGE-IB36 en presencia de iones metálicos e informaron que la inhibición observada por el cobre podría estar relacionada a la interacción de este metal con los grupos tioles de las proteínas, lo que modifica la conformación de la enzima y, por lo tanto, reduce su actividad. Establier & Gutiérrez (1978), al evaluar la actividad de un pool de proteasas extraídas de la masa visceral del boquerón en presencia de diferentes iones metálicos a distintos pH, observaron distintos comportamientos. A pH ácido, el cobre, el cobalto, el calcio y el níquel presentaron un efecto inhibidor, mientras que el zinc y el manganeso ejercieron un efecto activador. A pH alcalino, el cobre, el cobalto y el níquel continuaron siendo inhibidores, con el zinc sumándose a este comportamiento; mientras que el manganeso siguió siendo activador, y se añadió el calcio. Además, los autores evaluaron el efecto de la concentración sobre los metales inhibidores, observando que la inhibición del cobre

disminuía a medida que se reducía su concentración, lo que también sucedió con el zinc a pH ácido, siendo su efecto inhibitor nulo a concentraciones más bajas.

Luego de lo expuesto, es posible destacar la importancia de conocer el efecto de los iones metálicos sobre las enzimas utilizadas, así como las variables que pueden influir, como la concentración del ión metálico y el pH del medio de reacción. En este contexto, si se decide mejorar la actividad y la producción de péptidos bioactivos a partir de estas enzimas mediante el uso de iones metálicos, es esencial entender el efecto específico del ión en cuestión y determinar la concentración adecuada, ya que en algunos casos puede provocar el efecto contrario (inhibición), lo que reduciría la eficiencia de la hidrólisis.

#### **4.2. Estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con *Alcalase*® en estado libre**

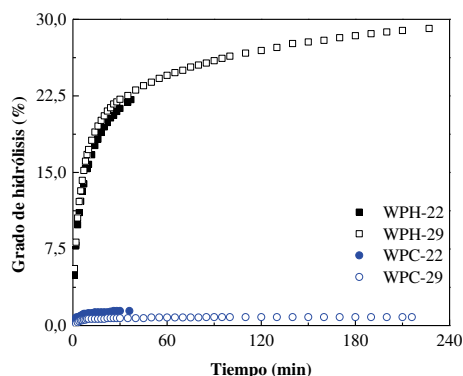
El uso de *Alcalase*® para la hidrólisis de proteínas y la caracterización de los hidrolizados ha sido previamente estudiado en el grupo de investigación (Fenoglio et al., 2012; Fenoglio et al., 2013; Vierling et al., 2015; Fenoglio et al., 2016). Los resultados mostraron una disminución de los péptidos hidrofóbicos responsables del sabor amargo y una mejora en los atributos sensoriales en comparación con las proteínas nativas del suero. Además, se observaron propiedades biológicas como actividad antimicrobiana, antioxidante y antihipertensiva en grados de hidrólisis inferiores al 20%. Los hidrolizados mostraron una inhibición del 100% de la enzima convertidora de la angiotensina a concentraciones de 3% (m/v) y también actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Eberhardt et al., 2017).

Estos resultados destacan la necesidad de profundizar en la relación entre las bioactividades observadas y las características fisicoquímicas de los hidrolizados. En este sentido, se propuso realizar estudios de fraccionamiento para identificar compuestos bioactivos según su carga, tamaño e hidrofobicidad (Pan et al., 2012; Conway et al., 2013; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2014; Ma et al., 2016). También se consideró importante evaluar el impacto de grados de hidrólisis superiores al 20% para enriquecer el conocimiento y optimizar futuras formulaciones de matrices alimenticias de base láctea (Welderufael & Jauregi, 2010; Adjonu et al., 2013; Cheison & Kulozik, 2017).

Este estudio preliminar con *Alcalase*® busca establecer una base para explorar cómo las bioactividades se relacionan con las características fisicoquímicas de los hidrolizados, orientando futuras investigaciones en esta línea.

#### 4.2.1. Hidrólisis del WPC-80

La hidrólisis del concentrado de proteína de suero lácteo al 7% (m/v) de proteínas (**Figura 25**), realizada a pH y temperatura constantes, permitió obtener dos hidrolizados con grados de hidrólisis del 22,1 y 29,1%, denominados WPH-22 y WPH-29, respectivamente, tras 37 y 227 min de hidrólisis. Los altos valores de grados de hidrólisis se atribuyen claramente a la amplia especificidad de la enzima utilizada (Osman et al., 2016).



**Figura 25.** Evolución de la hidrólisis de WPC-80 con *Alcalase*® en estado libre.

La gráfica muestra que la tasa de hidrólisis experimenta una desaceleración a partir de los 30 min de reacción, posiblemente por efectos inhibitorios de los productos generados y/o por desnaturalización enzimática (Martínez-Montaña et al., 2022). Por su parte, el WPC-80 sometido a las mismas condiciones de hidrólisis, pero en ausencia de enzima (control; WPC-22 y WPC-29), presentó valores de DH inferiores al 2% (1,44 y 0,83%, respectivamente). Esta baja hidrólisis, aunque presente, puede explicarse por el efecto de la temperatura sobre las proteínas del suero, que provocó la ruptura de enlaces peptídicos no específicos (Adjonu et al., 2013).

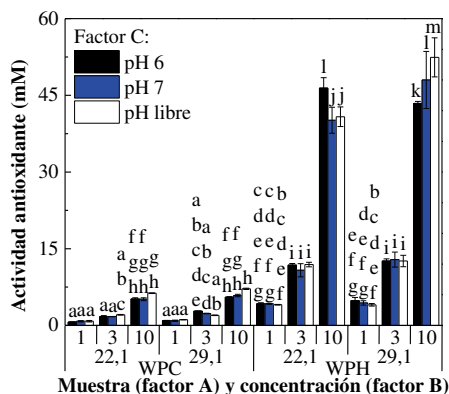
#### 4.2.2. Caracterización de los hidrolizados obtenidos

##### 4.2.2.1. Análisis de las propiedades biológicas de interés

Los péptidos bioactivos provenientes de fuentes naturales constituyen una alternativa sostenible tanto para el tratamiento de enfermedades como para la conservación de alimentos. A diferencia de los medicamentos sintéticos, estos péptidos no presentan los efectos secundarios comunes asociados a fármacos químicos y, además, son más seguros que los aditivos sintéticos (Zou et al., 2016; Sah et al., 2018).

Las **Figuras 26 a 28** presentan las bioactividades evaluadas en los hidrolizados y controles obtenidos. Se observa que tanto la actividad antioxidante como la actividad antihipertensiva de los hidrolizados fueron significativamente superiores a las de los controles.

Los hidrolizados mostraron una AAO en el rango de 4,03 a 52,42 mM y una AAH entre 70,46 y 91,01%, mientras que los controles presentaron valores de AAO y AAH en un rango más bajo y/o menos amplio (0,66 a 7,16 mM y 2,03 a 29,02%, respectivamente). Estos resultados demuestran que la hidrólisis de las proteínas de suero favoreció la liberación de péptidos bioactivos encriptados en la proteína nativa.

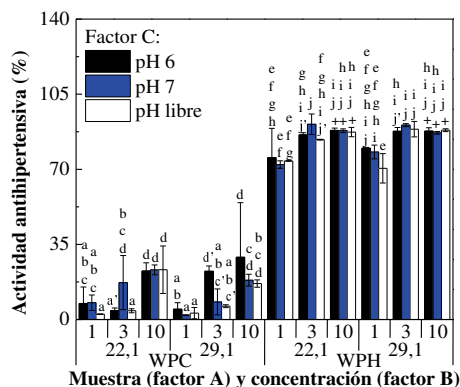


**Figura 26.** Actividad antioxidante de hidrolizados (WPH-22 y WPH-29) y controles (WPC-22 y WPC-29), evaluada a diferentes concentraciones [1, 3 y 10% (m/v)] y valores de pH. Resultados del ANOVA de múltiples vías: -factores A y B e interacciones AB, AC y ABC: \*; -factor C e interacción BC: NS; -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); -letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Otras investigaciones han reportado resultados similares. Como se mencionó en la **sección 1.3.1**, al trabajar no sólo con proteínas lácteas, sino también con otros sustratos e incluso enzimas diferentes, varios autores han reportado a lo largo de los años un aumento de la AAO y/o de la AAH como consecuencia de la reacción de hidrólisis (Mullally et al., 1997; Pan et al., 2012; Conway et al., 2013; Mann et al., 2015; Naik et al., 2013; Ibrahim et al., 2017). La mayor bioactividad en los hidrolizados se asocia, como señalan Naik et al. (2013), con los cambios que se producen en las características moleculares de las proteínas, tales como la reducción del peso molecular, el aumento de la carga, y la exposición de grupos hidrofóbicos y de cadenas laterales de aminoácidos reactivos.

La variación del pH no tuvo una influencia global en la AAO ni en la AAH, excepto en las muestras de hidrolizado preparadas a una concentración de 10% (m/v). En este caso, se observó un efecto antioxidante más alto a pH alcalino para el WPH-29, el cual disminuyó a pH neutro, mientras que sucedió lo contrario con el WPH-22. En cuanto a la AAH, no se registraron cambios significativos en los hidrolizados a diferentes valores de pH. Estos resultados son interesantes, ya que sugieren que los hidrolizados podrían incorporarse a preparaciones de alimentos funcionales sin perder actividad debido a variaciones de pH. Por su parte, la

concentración de la muestra mostró una influencia estadísticamente significativa sobre los resultados de ambas bioactividades, lo que la convierte en un factor clave a considerar al planificar la formulación de un alimento.

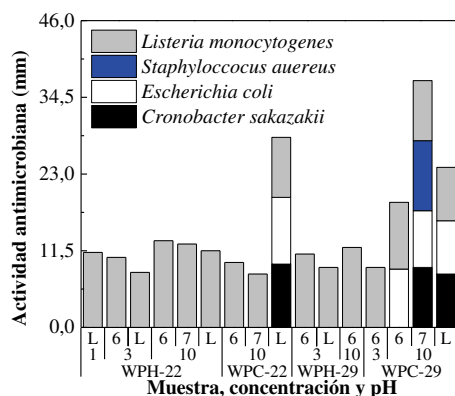


**Figura 27.** Actividad antihipertensiva de hidrolizados (WPH-22 y WPH-29) y controles (WPC-22 y WPC-29), evaluada a diferentes concentraciones [1, 3 y 10% (m/v)] y valores de pH. Resultados del ANOVA de múltiples vías: -factores A y B: \*; -factor C e interacciones AB, AC, BC y ABS: NS; -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ). ' : dilución 1/2. +: dilución 1/5.

El aumento del grado de hidrólisis no tuvo un efecto significativo sobre la AAO ni la AAH de los hidrolizados, excepto en las muestras preparadas a una concentración de 10% (m/v). En estos casos, el efecto antioxidante fue mayor en el WPH-29 tanto a pH alcalino como a pH neutro. Por lo tanto, la diferencia del 7% entre los DH obtenidos no resultó estadísticamente significativa. Estos resultados son coherentes con estudios previos, donde se ha reportado que una hidrólisis extensiva no mejora las bioactividades, e incluso puede reducirlas (You et al., 2009; Wang et al., 2016; Martínez-Montaña, 2022). Por ende, una hidrólisis controlada y limitada (no más del 20% de DH, utilizando el método *pH-stat*) con la preparación enzimática *Alcalase*® sería suficiente para obtener hidrolizados de proteína de suero con propiedades bioactivas adecuadas, viables para su incorporación como ingredientes alimentarios funcionales (Eberhardt et al., 2019). En la misma línea, otras propiedades tecnofuncionales relevantes, como la solubilidad, la emulsificación, la formación de espuma y la gelificación, que también se ven afectadas por el DH, no se verían comprometidas (Agyei et al., 2016). Estos resultados subrayan la importancia de seleccionar el DH adecuado para obtener las propiedades tecnofuncionales deseadas.

En cuanto a la actividad antimicrobiana (Figura 28), los hidrolizados mostraron halos de inhibición fundamentalmente a las concentraciones del 3 y 10% (m/v), y especialmente frente a *Listeria monocytogenes*. Estos halos fueron significativamente mayores que los observados en sus controles correspondientes. También se registró capacidad antagonística frente a *Cronobacter sakazakii*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, estos efectos inhibitorios sólo

se presentaron en los controles y no en los hidrolizados. Estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana observada podría ser inespecífica, provocada fundamentalmente por el tratamiento térmico al que fueron sometidos los controles, el cual llevó a la generación de compuestos antimicrobianos de naturaleza no proteica. Jrad et al. (2014) y Minj et al. (2021) también reportaron la presencia de AAM tanto hidrolizados como en proteínas sin hidrolizar.



**Figura 28.** Condiciones experimentales que mostraron actividad antimicrobiana en hidrolizados (WPH-22 y WPH-29) y controles (WPC-22 y WPC-29), evaluadas a distintas concentraciones [1, 3 y 10% (m/v)] y valores de pH (6, 7 y libre). Ninguna de las muestras presentó actividad contra *Bacillus cereus* DBFIQ B 7.

En comparación con las otras bioactividades evaluadas, diversos estudios en la bibliografía han informado resultados similares para hidrolizados de proteínas lácteas, es decir, efectos antimicrobianos menores en comparación con otras propiedades como la actividad antioxidante y antihipertensiva (Alizadeh & Aliakbarlu, 2020), o incluso la ausencia de AAM (Sinha et al., 2007; Ballatore et al., 2021).

#### 4.2.2.2. Efecto del fraccionamiento de los hidrolizados sobre la actividad biológica

Con el fin de evaluar la relación estructura-actividad de los péptidos bioactivos y la influencia del grado de hidrólisis en sus características fisicoquímicas y bioactividades, se emplearon distintas técnicas cromatográficas de fraccionamiento. Para ello, las muestras de hidrolizados, preparadas a una concentración de 4% (m/v), fueron tratadas previamente mediante filtración y centrifugación antes de ser fraccionadas (Tabla 11 y Figura 29), con el fin de eliminar cualquier material no soluble o precipitado que pudiera interferir o dañar los sistemas cromatográficos utilizados.

En el caso del WPH-22, este tratamiento no afectó el contenido proteico, la bioactividad (Tabla 11) ni el perfil peptídico (Figura 29). Esto se debe a que los péptidos bioactivos, especialmente asociados con actividades antioxidantes y antihipertensivas, suelen ser de bajo peso

molecular y altamente solubles en soluciones *buffers*. Por lo tanto, estos tratamientos no afectarían la bioactividad observada en el WPH crudo, como se ha reportado en estudios previos sobre la purificación de péptidos bioactivos (Soladoye et al., 2015; Xia et al., 2020). En contraste, para el WPH-29 se observó una concentración o mejora tanto en el contenido proteico como en la bioactividad, aunque el perfil peptídico prácticamente no cambió. Este fenómeno podría deberse al mayor tiempo de hidrólisis empleado en el WPH-29 respecto al WPH-22, lo que generó un incremento en la solubilización del sustrato y, por tanto, un mayor efecto de corte enzimático y mejora en la bioactividad observada. Simultáneamente, el proceso de centrifugación podría haber contribuido parcialmente a estos resultados (Walstra, 2003; Wouters et al., 2016).

**Tabla 11.** Proteína, actividad antioxidante (AAO) y actividad antihipertensiva (AAH) de controles, hidrolizados sin tratar e hidrolizados tratados, preparados al 4% (m/v).

DH (%)	Muestra	Proteína (µg)	AAO (mM)	AAH (%)
22,1	WPC	2620,18±192,28 <sup>c</sup>	6,90±0,02 <sup>b</sup>	3,72±3,77 <sup>a</sup>
	WPH	1102,89±9,30 <sup>c</sup>	10,89±0,23 <sup>c</sup>	87,21±0,35 <sup>c</sup>
	WPH-CF	1185,61±33,91 <sup>c</sup>	10,45±0,08 <sup>c</sup>	87,25±0,26 <sup>c</sup>
	WPH-P	83,73±11,47 <sup>a</sup>	0,84±0,04 <sup>a</sup>	42,17±4,42 <sup>b</sup>
29,1	WPC	2253,95±9,30 <sup>d</sup>	0,95±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
	WPH	920,88±16,13 <sup>b</sup>	11,77±0,07 <sup>d</sup>	88,78±0,23 <sup>c</sup>
	WPH-CF	1111,93±12,41 <sup>c</sup>	13,57±0,95 <sup>e</sup>	95,49±2,80 <sup>d</sup>
	WPH-P	82,63±1,86 <sup>a</sup>	0,20±0,08 <sup>a</sup>	45,74±0,29 <sup>b</sup>
<b>Factor A: DH</b>		*	*	NS
<b>Factor B: Muestra</b>		*	*	*
<b>Interacción AB</b>		*	*	*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

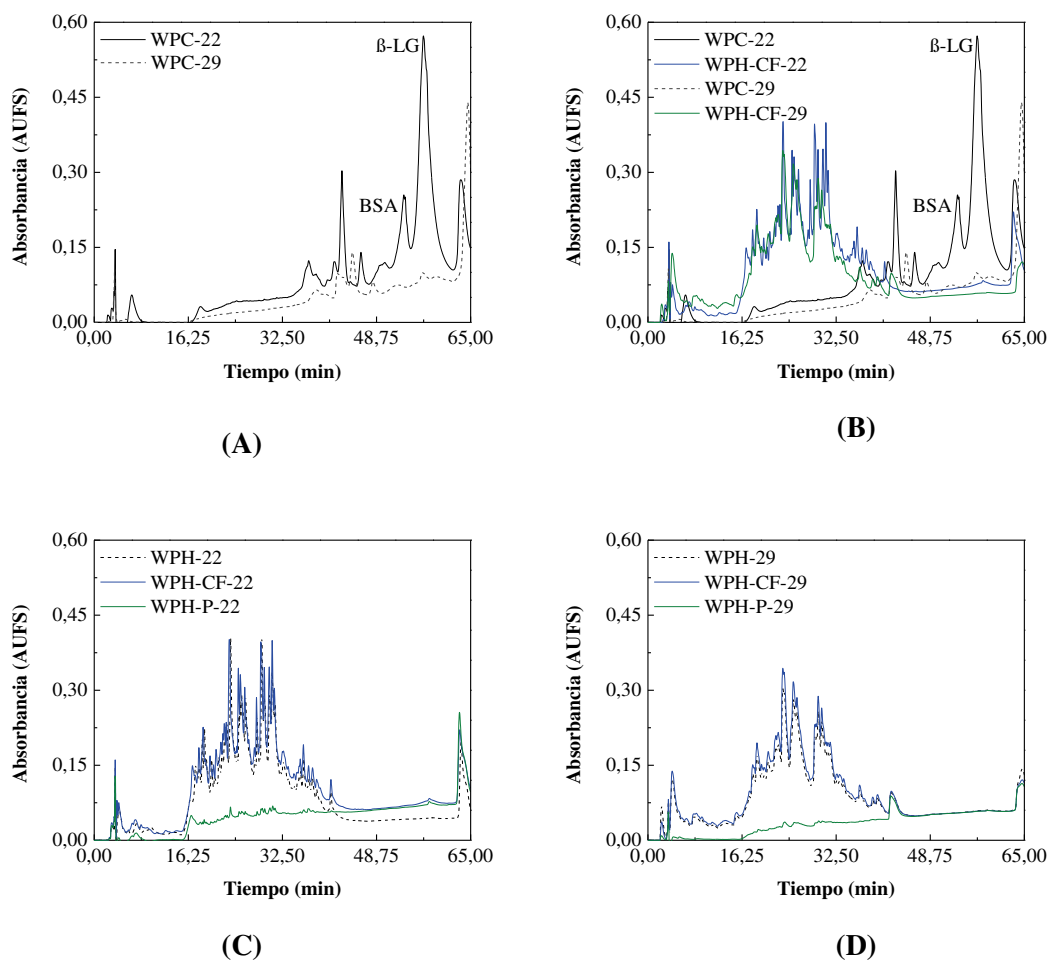
NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Letras diferentes, para cada característica evaluada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

<sup>†</sup> dilución 1/2.

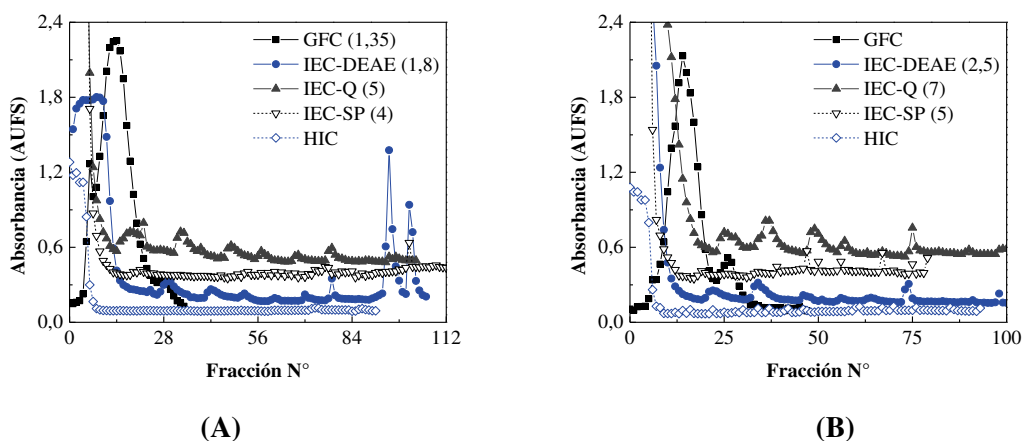
La **Figura 29** presenta los cromatogramas de las muestras obtenidos mediante la RP-HPLC. En el cromatograma del WPC-22 se observan claramente los picos correspondientes a la albúmina sérica bovina (BSA) y a la  $\beta$ -lactoglobulina, entre los tiempos de elución de 48,75 a 65 min (Eberhardt et al., 2019), que desaparecen después de la hidrólisis enzimática (WPH-22). En

el caso del WPC-29, no se detectaron los picos de la BSA y  $\beta$ -lactoglobulina. Esto podría deberse a una desnaturalización parcial de estas proteínas durante aproximadamente 4 h de incubación a 50°C, lo que favorecería su agregación y eventual precipitación. Como consecuencia, su concentración efectiva disminuiría drásticamente en el análisis cromatográfico. Por su parte, en los cromatogramas de los hidrolizados se observa la desaparición completa de los picos correspondientes a las proteínas intactas y la aparición de múltiples picos entre los 15 y 40 min de elución, con perfiles de péptidos que difieren visualmente según el grado de hidrólisis.



**Figura 29.** Análisis RP-HPLC de hidrolizados (**B-D**) y controles (**A**), preparados al 4% (m/v). BSA: albúmina sérica bovina. B-LG:  $\beta$ -lactoglobulina.

Respecto al fraccionamiento de los hidrolizados tratados mediante distintas técnicas cromatográficas, la **Figura 30** resume los cromatogramas obtenidos a una lectura de absorbancia de 280 nm. En ellos se aprecia la complejidad fisicoquímica de los hidrolizados, observándose un fraccionamiento tanto por carga, como por tamaño e hidrofobicidad.



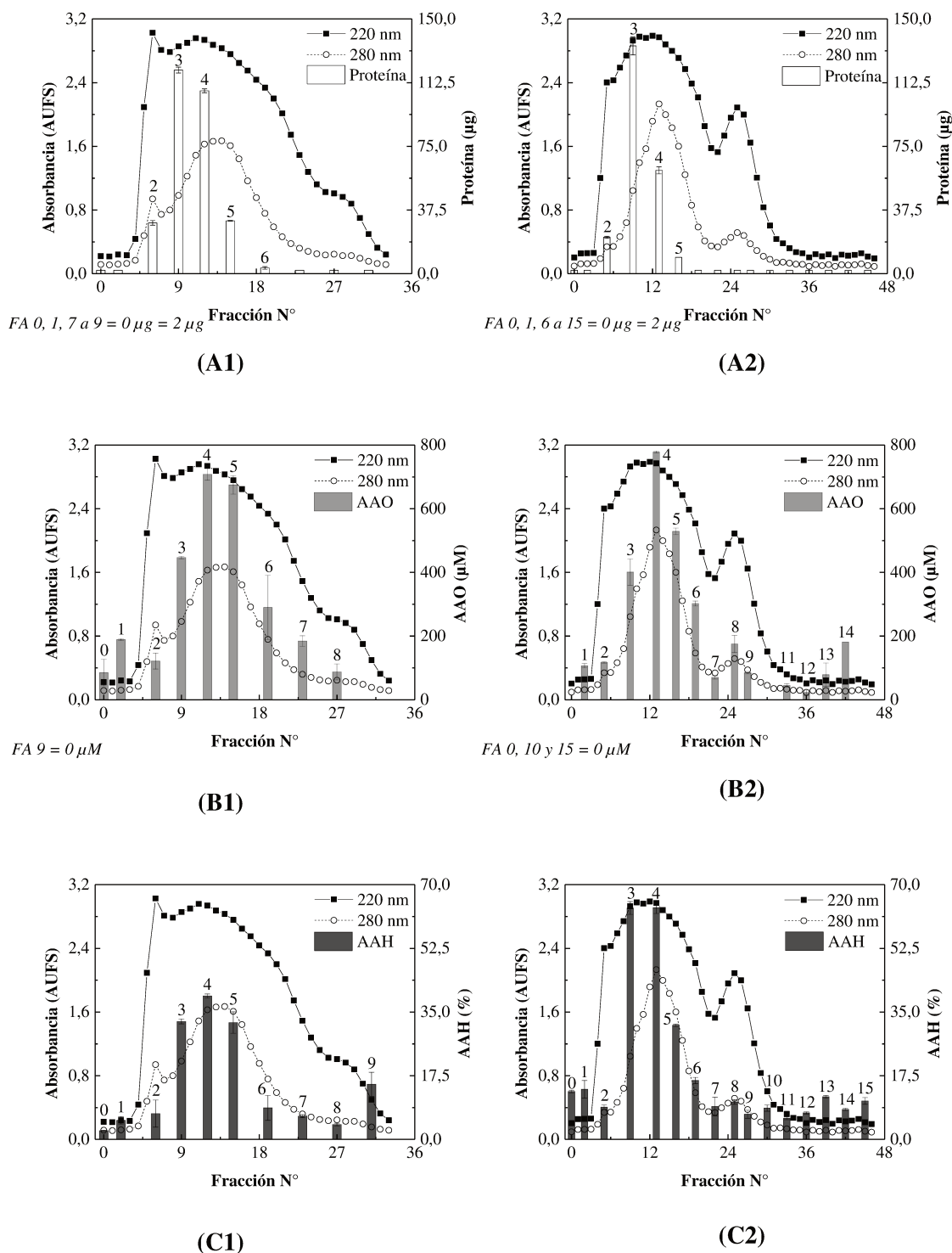
**Figura 30.** Perfiles de elución obtenidos tras fragmentar los hidrolizados tratados empleando diferentes técnicas cromatográficas. **(A)** 22,1%. **(B)** 29,1%. Algunas absorbancias fueron ajustadas por un factor de escalamiento (indicado entre paréntesis) para facilitar la visualización.

#### 4.2.2.2.1. Cromatografía de filtración en gel

La cromatografía de filtración en gel permitió fraccionar los hidrolizados según su tamaño, obteniéndose 33 y 43 fracciones a partir del WPH-22 y del WPH-29, respectivamente. Estas fracciones se agruparon en función del perfil de elución, resultando en 10 fracciones agrupadas (FA) para el WPH-22 (0 a 9) y 16 FA para el WPH-29 (0 a 15).

El contenido proteico de las fracciones agrupadas se muestra en las **Figuras 31.A (Tabla A5.1, Anexo 5)**. En términos generales, la proteína presente se concentró mayoritariamente entre las FA 2 a 5 de ambos hidrolizados, alcanzando valores de 21 a 134  $\mu\text{g}$ . En particular, la FA-3 mostró los valores más altos con  $119,89 \pm 1,74 \mu\text{g}$ , en el caso del WPH-22, y  $134,17 \pm 5,27 \mu\text{g}$ , en el caso del WPH-29.

En cuanto a las bioactividades, los mayores valores de AAO se encontraron en las FA 4 y 5 de ambos hidrolizados, registrándose  $707,95 \pm 18,59$  y  $674,63 \pm 29,00 \mu\text{M}$  para el WPH-22, y  $778,26 \pm 2,61$  y  $528,71 \pm 10,25 \mu\text{M}$  para el WPH-29, respectivamente (**Figuras 31.B**). En cuanto a la AAH (**Figuras 31.C**), las FA obtenidas a partir del WPH-29 mostraron los mejores resultados, destacándose las FA 3 y 4 con inhibiciones de la ECA del  $63,59 \pm 1,76$  y  $63,67 \pm 1,59\%$ , respectivamente. Para el WPH-22, la mayor inhibición observada fue cercana al 40% en la FA-4, mientras que las FA 3 y 5 presentaron valores alrededor del 32%, inferiores a los obtenidos con el WPH-29 (aproximadamente 63%).



**Figura 31.** Caracterización de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados por cromatografía de filtración en gel. (A) Proteína. (B) Actividad antioxidante (AAO). (C) Actividad antihipertensiva (AAH). (1) 22,1%. (2) 29,1%.

En resumen, las FA 3, 4 y 5 de ambos hidrolizados fueron las que mostraron las bioactividades más altas, además de evidenciar una mayor concentración de péptidos, reflejada

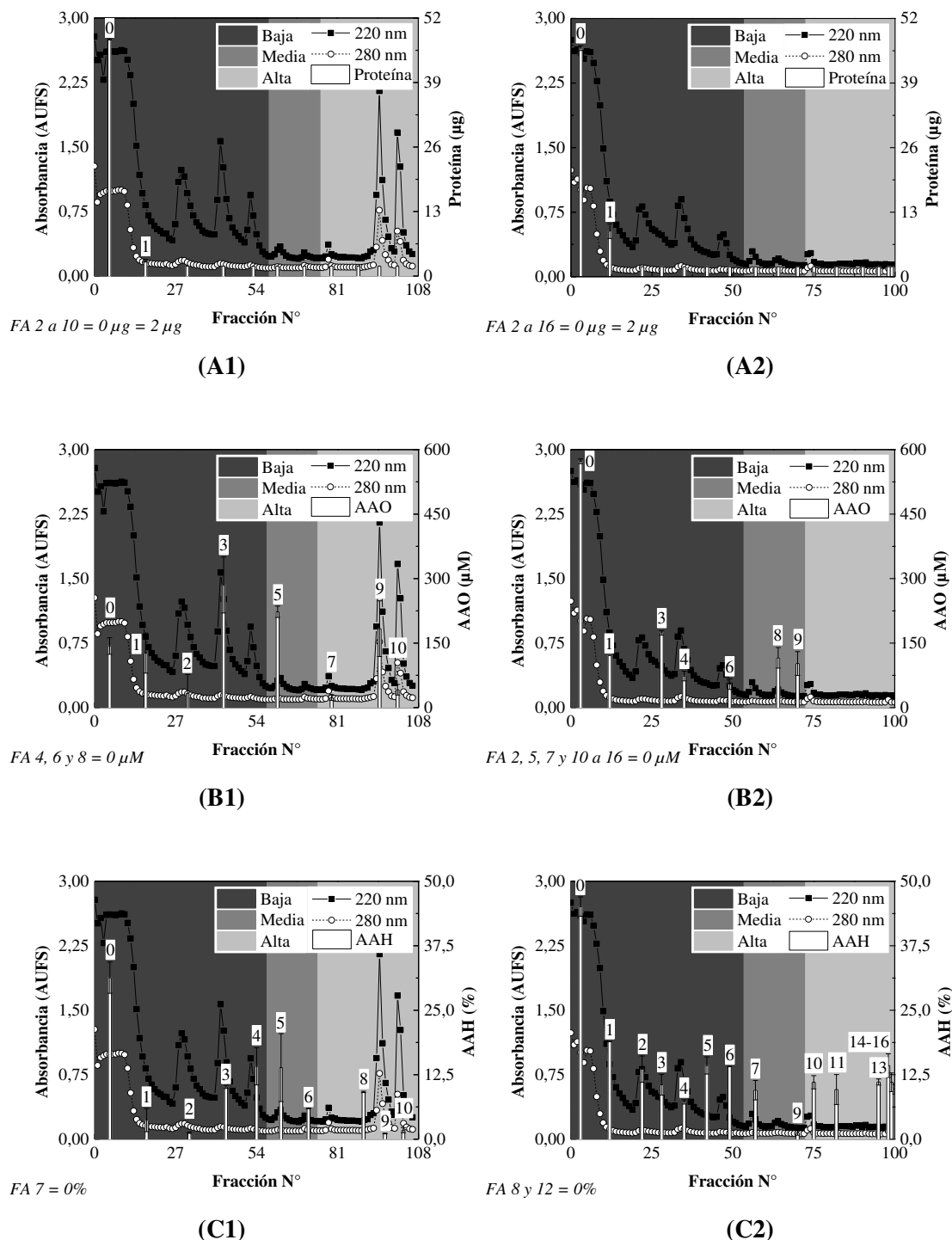
en altos valores de proteína. En el cromatograma, estas FA incluyen fracciones eluidas después de aproximadamente 16 mL de fase móvil (~31 min), un valor inferior al volumen de columna (47 mL). Esto sugiere que el peso molecular de los péptidos presentes en los hidrolizados estaría dentro del rango de tamaño de poro de la resina utilizada (1000-5000 Da). Además, se observa que a tiempos de retención mayores también se registraron actividades antioxidantes y antihipertensivas, aunque en menor medida que las demás FA, con valores en el rango de 22,58-184,40  $\mu\text{M}$  y 4,05-15,13%, respectivamente. Estas bioactividades podrían estar asociadas a compuestos de menor peso molecular, como péptidos cortos constituidos por 2 a 6 residuos de aminoácidos.

El aumento del 7% en el DH no afectó la AAO de los hidrolizados obtenidos, lo que indica que el fraccionamiento de ambos hidrolizados generó FA con efecto antioxidante y perfil de distribución similares. Sin embargo, se observaron FA activas a tiempos de retención mayores tras el incremento en el DH. En cuanto a la AAH, el aumento del DH tuvo su efecto, ya que las FA del WPH-29 mostraron los valores más altos de esta bioactividad. Además, al igual que con la AAO, se observaron FA antihipertensivas a tiempos de retención mayores. El análisis de 42 péptidos antioxidantes provenientes de diferentes fuentes proteicas reveló que estos péptidos poseen entre 3 a 6 aminoácidos, con pesos moleculares inferiores a 1 kDa. La distribución de pesos moleculares de estos péptidos varía de 400 a 650 Da, representando el 70% de los 42 péptidos estudiados (Zou et al., 2016). En cuanto a los péptidos inhibidores de la ECA, estos presentan entre 2 y 12 aminoácidos, lo que corresponde a un rango de peso molecular entre 150 y 800 Da (Pan et al., 2012). Estos rangos de peso molecular pueden estar asociados a los altos DH alcanzados, los cuales favorecieron la obtención de péptidos de bajo peso molecular. Estas características no sólo incrementan la bioactividad, sino que también facilitan su absorción en el tracto intestinal, promoviendo así sus efectos (Tondo et al., 2019; Martínez-Montaña et al., 2022). A su vez, los resultados indican que la cantidad de fracciones agrupadas bioactivas obtenidas con el WPH-29 fue mayor en comparación con la obtenida con el WPH-22, probablemente debido a un fraccionamiento más alto de péptidos bioactivos como resultado de un mayor DH.

#### 4.2.2.2.2. Cromatografía de intercambio iónico

Las cromatografías de intercambio iónico permitieron fraccionar los hidrolizados según su carga, obteniéndose: **a)**- 106 y 100 fracciones a partir del WPH-22 y del WPH-29, respectivamente, utilizando la IEC-DEAE; **b)**- 103 y 101 fracciones a partir del WPH-22 y del WPH-29, respectivamente, mediante la IEC-Q; y **c)**- 112 y 79 fracciones a partir del WPH-22 y del WPH-29, respectivamente, usando la IEC-SP. Estas fracciones se agruparon en función del perfil de elución, resultado en: **a)**- 11 FA para el WPH-22 (0 a 10) y 17 FA para el WPH-29 (0 a 16) a partir de la IEC-DEAE; **b)**- 16 FA para el WPH-22 (0 a 15) y 14 FA para el WPH-29 (0 a

13) con la IEC-Q; y c)- 11 FA para el WPH-22 (0 a 10) y 16 FA para el WPH-29 (0 a 15) a partir de la IEC-SP. El contenido proteico y la bioactividad de cada fracción agrupada se presentan en las Figuras 32 a 34 (Tablas A5.2 a A5.4, Anexo 5).



**Figura 32.** Caracterización de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados por cromatografía de intercambio aniónico débil. (A) Proteína. (B) Actividad antioxidante (AAO). (C) Actividad antihipertensiva (AAH). (1) 22,1%. (2) 29,1%. Baja, Media, Alta: fuerza iónica del *buffer* de elución.

En la cromatografía de intercambio aniónico débil (**Figura 32; Tabla A5.2, Anexo 5**), la FA-0 presentó los valores más altos de proteína en ambos hidrolizados, siendo  $47,70\pm 0,12$   $\mu\text{g}$  para el WPH-22 y  $46,04\pm 0,50$   $\mu\text{g}$  para el WPH-29. En cuanto a la AAO, las fracciones del WPH-22 que mostraron los mayores valores fueron, en orden decreciente, las FA 3, 5 y 9 con valores de  $285,08\pm 65,18$ ,  $222,81\pm 13,20$  y  $183,53\pm 64,72$   $\mu\text{M}$ , respectivamente. Para el WPH-29, las FA con mayor AAO fueron las FA 0 y 3, con valores de  $572,88\pm 5,46$  y  $173,87\pm 5,31$   $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estos resultados sugieren que la AAO está relacionada con la carga de los péptidos, lo que explicaría la presencia de fracciones bioactivas a fuerzas iónicas elevadas, como ocurre con la FA-9 del WPH-22. Sin embargo, la mayor concentración de péptidos antioxidantes se encuentra en zonas de baja fuerza iónica (aproximadamente el 56% en el WPH-22 y el 82% en el WPH-29), lo que posiblemente corresponde a sustancias con una o dos cargas negativas, al pH en el que se realizó la cromatografía. Asimismo, esto sugiere que la presencia de péptidos ácidos, que contienen los aminoácidos ácido glutámico y ácido aspártico, podría ser responsable de la AAO observada. En cuanto al aumento del DH, este afectó el perfil de la bioactividad analizada, ya que se observó la desaparición de fracciones bioactivas a tiempos de retención mayores.

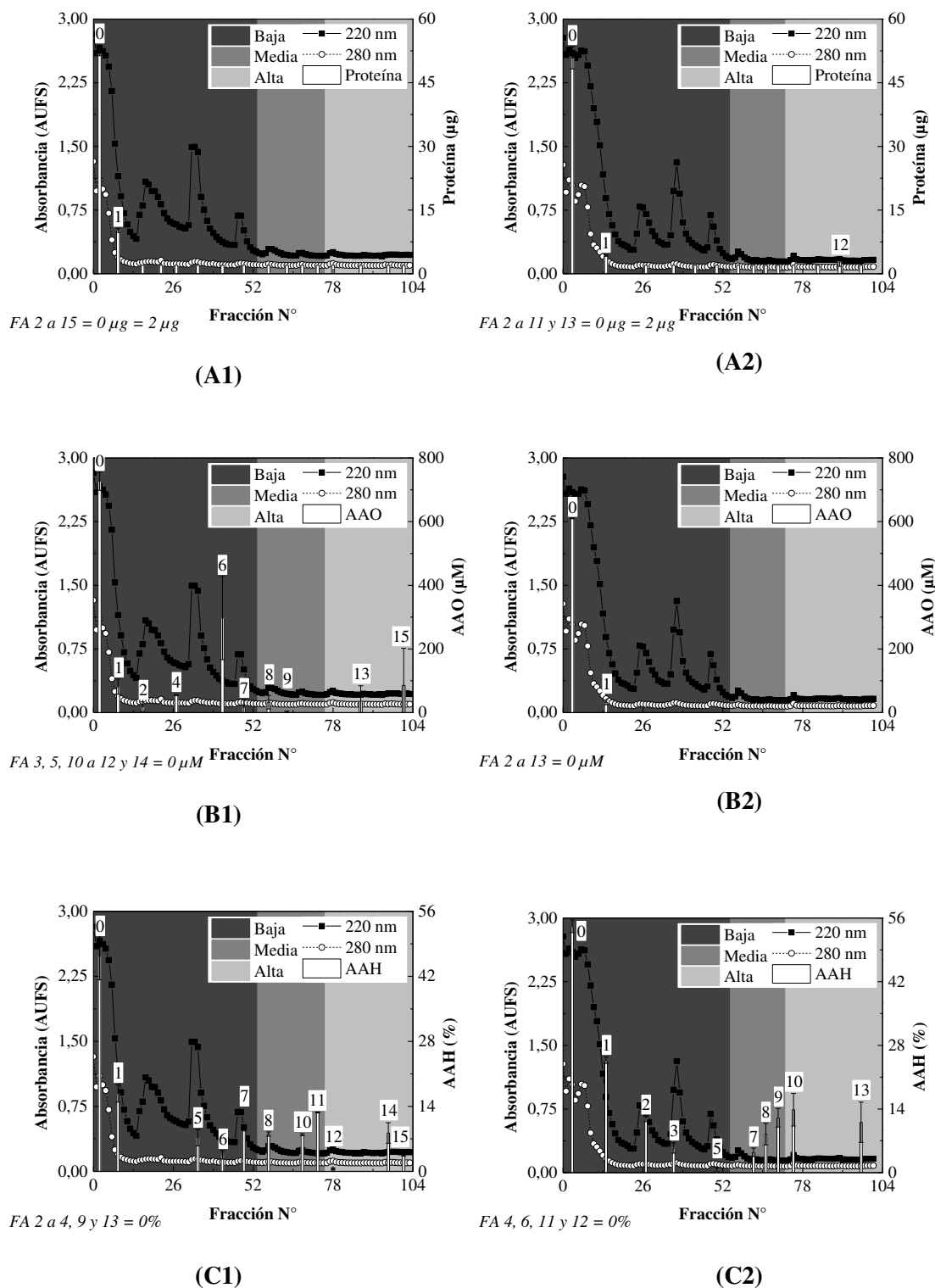
En relación a la AAH, los valores más altos se presentaron en la FA-0, seguida de las FA 4 y 5 del WPH-22, con un  $31,30\pm 3,02$ ,  $14,12\pm 3,60$  y  $13,88\pm 6,58\%$  de inhibición de la ECA, respectivamente. Para el WPH-29, las fracciones con mayor AAH fueron las FA 0, 1 y 5, con valores de  $45,09\pm 1,88$ ,  $18,92\pm 0,00$  y  $14,29\pm 1,66\%$ , respectivamente. Esta bioactividad también se concentró mayoritariamente en zonas de baja fuerza iónica, con aproximadamente un 66% para el WPH-22 y un 61% para el WPH-29, al igual que lo observado para la AAO. Sin embargo, a diferencia de ésta, el aumento en el DH incrementó el número fracciones agrupadas con propiedades antihipertensivas a tiempos de retención más altos, representando un 33% del total.

En las cromatografías de intercambio aniónico fuerte (**Figura 33; Tabla A5.3, Anexo 5**) e intercambio catiónico fuerte (**Figura 34; Tabla A5.4, Anexo 5**), la FA-0 de ambos hidrolizados fue la que presentó los valores más altos de las características evaluadas. Con el intercambiador aniónico se alcanzaron valores de  $51,74\pm 0,37$   $\mu\text{g}$  de proteína,  $726,85\pm 28,18$   $\mu\text{M}$  de Trolox y  $46,37\pm 5,13\%$  de inhibición de la ECA para el WPH-22 y  $50,86\pm 2,61$   $\mu\text{g}$ ,  $610,28\pm 1,29$   $\mu\text{M}$  Trolox y  $54,19\pm 1,39\%$  de inhibición de la ECA para el WPH-29. Mientras que, con el intercambiador catiónico la FA-0 registró valores de  $58,32\pm 0,50$   $\mu\text{g}$  de proteína,  $378,84\pm 16,41$   $\mu\text{M}$  de Trolox y  $46,55\pm 15,43\%$  de inhibición de la ECA para el WPH-22 y  $47,00\pm 1,12$   $\mu\text{g}$  de proteína,  $467,91\pm 18,81$   $\mu\text{M}$  de Trolox y  $38,78\pm 0,59\%$  para el WPH-29. Es importante señalar que la FA-0 corresponde a la muestra final después de la recirculación en la columna para la adsorción de los péptidos en la fase estacionaria, lo que implica que incluye todos los compuestos que no fueron retenidos por las resinas. Cabe destacar además que, con un contenido de proteínas estadísticamente igual, la FA-0 del hidrolizado con el menor DH obtenida con el intercambiador

aniónico fuerte mostró mayor AAO, en comparación con la del hidrolizado con mayor DH. Sin embargo, la FA-0 de este último presentó mayor AAH. En contraste a las fracciones de muestra recirculada, las FA 2 a 15 del WPH-22 y las FA 2 a 13 del WPH-29 registraron una concentración de proteínas tan baja que la técnica aplicada no permitió detectar su presencia, sin embargo, algunas de ellas evidenciaron bioactividad. En particular, las FA del WPH-22 presentaron efectos antioxidantes, destacándose la FA-6 con  $297,21 \pm 130,82 \mu\text{M}$  de Trolox, mientras que varias FA de ambos hidrolizados mostraron AAH, aunque con valores inferiores al 25%.

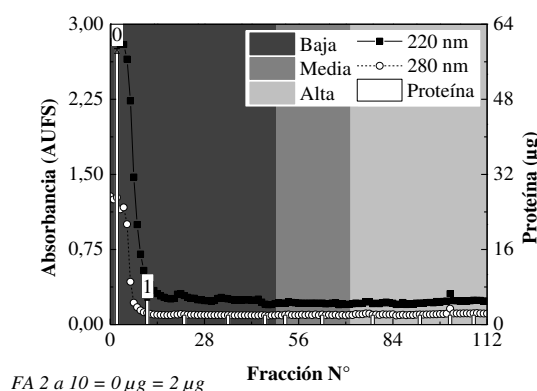
En cuanto al intercambiador catiónico, la FA-0 del WPH-29 fue la única de las 16 fracciones que presentó efectos antioxidantes (a diferencia de las FA del WPH-22). Esto sugiere que la mayor concentración de sustancias con AAO (resultantes de un alto DH) no resultó retenida por el intercambiador catiónico fuerte, lo que indicaría que dichos péptidos no tendrían un carácter catiónico destacable. Sin embargo, se observó una mayor retención de fracciones con AAH. Hernández-Ledesma et al. (2011) han planteado la hipótesis de que la carga positiva de los residuos lisina (grupo amino) y arginina (grupo guanidina) en el extremo C-terminal podría contribuir a la actividad inhibitoria de la ECA. Al comparar ambos DH, la FA-0 del WPH-29 presentó una mayor AAO con menor contenido proteico, pero menor AAH.

En cuanto a la relación entre la bioactividad presentada por las FA de los intercambiadores aniónico fuerte y catiónico fuerte, y la fuerza iónica empleada para eluir las, se encontró lo siguiente: en el intercambiador aniónico, la AAO predominó en la zona baja tanto para el WPH-22 (aproximadamente un 88% del total) como para el WPH-29 (100% del total). Esto indica que, en ambos casos, la mayor parte de la actividad antioxidante se concentró en las fracciones eluidas con menor fuerza iónica. Si bien el aumento del DH no modificó la fracción predominante (zona baja), sí tuvo efecto en la distribución restante: en el WPH-22 se observó un 3% del total de la AAO en la zona media y un 9% en la zona alta, mientras que en el WPH-29 estas dos fracciones desaparecieron, concentrándose toda la bioactividad exclusivamente en la zona baja. En cuanto a la AAH, también predominó en la zona de menor fuerza iónica en ambos hidrolizados, representando aproximadamente el 67% del total en el WPH-22 y el 66% en el WPH-29. Sin embargo, al igual que en la AAO, el cambio en el DH afectó la distribución del resto de la bioactividad: en la zona media, la AAH disminuyó del 23% en el WPH-22 al 17% en el WPH-29, mientras que, en la zona alta aumentó del 10 al 17%, respectivamente. El comportamiento observado, tanto para la AAO como para la AAH, puede explicarse considerando que la mayoría de las moléculas con actividad biológica en estos hidrolizados son péptidos pequeños, compuestos por 3 o 4 aminoácidos. Debido a su tamaño reducido, estas especies presentan una baja carga neta (generalmente no más de 2 o 3 cargas), lo que favorece su elución en condiciones de baja fuerza iónica.

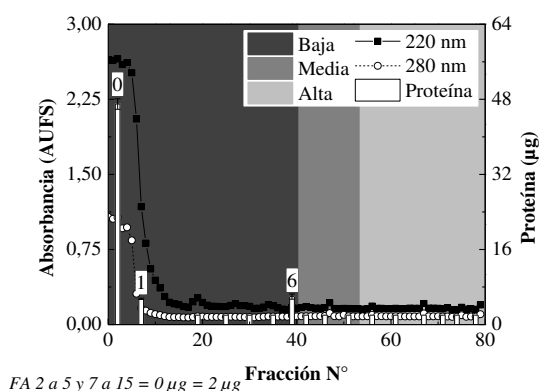


**Figura 33.** Caracterización de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados por cromatografía de intercambio aniónico fuerte. **(A)** Proteína. **(B)** Actividad antioxidante (AAO). **(C)** Actividad antihipertensiva (AAH). **(1)** 22,1%. **(2)** 29,1%. Baja, Media, Alta: fuerza iónica del *buffer* de elución.

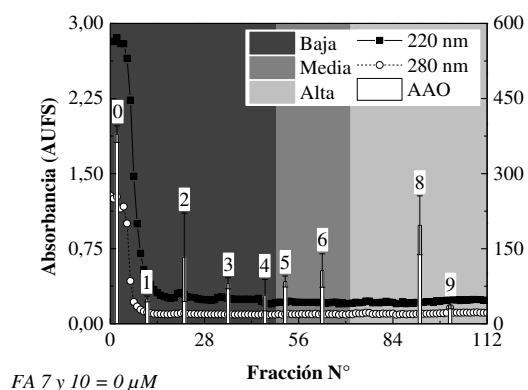
En relación a los resultados obtenidos a partir del intercambiador catiónico, tanto la AAO como la AAH se concentraron en la zona de fuerza iónica baja en el caso del WPH-22 (aproximadamente el 62 y 71% del total, respectivamente), donde la FA-2 mostró efectos antioxidantes de  $132,95 \pm 88,36 \mu\text{M}$  y las FA 1, 3 y 4 evidenciaron efectos inhibidores de la ECA con porcentajes de inhibición entre el 12% y el 14%. No obstante, aunque la FA-8 se encuentra en la zona de alta fuerza iónica también registró efectos antioxidantes interesantes ( $196,77 \pm 58,77 \mu\text{M}$  de Trolox), superiores a los de la FA-2. Para el WPH-29, la AAO se concentró exclusivamente en la zona de baja fuerza iónica, representando el 100% del total, sin detectarse actividad en las zonas de fuerza iónica media o alta. En cuanto a la AAH, esta se distribuyó principalmente en las zonas de baja y alta fuerza iónica, representando el 38 y 46% del total, respectivamente, mientras que la zona de media fuerza iónica implicó solo un 16%. Se destacaron particularmente las FA 10 y 11, ambas ubicadas en la zona de alta fuerza iónica, con porcentajes de inhibición de la ECA de  $30,08 \pm 0,92$  y  $24,24 \pm 0,42\%$ , respectivamente.



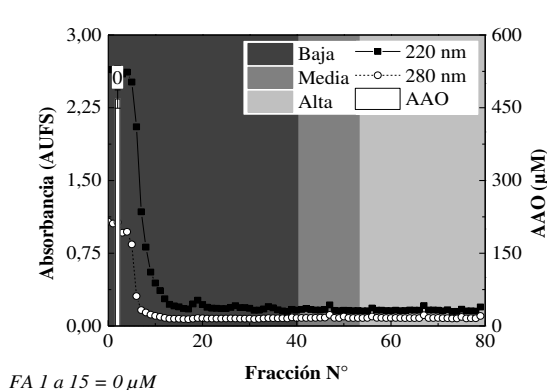
**(A1)**



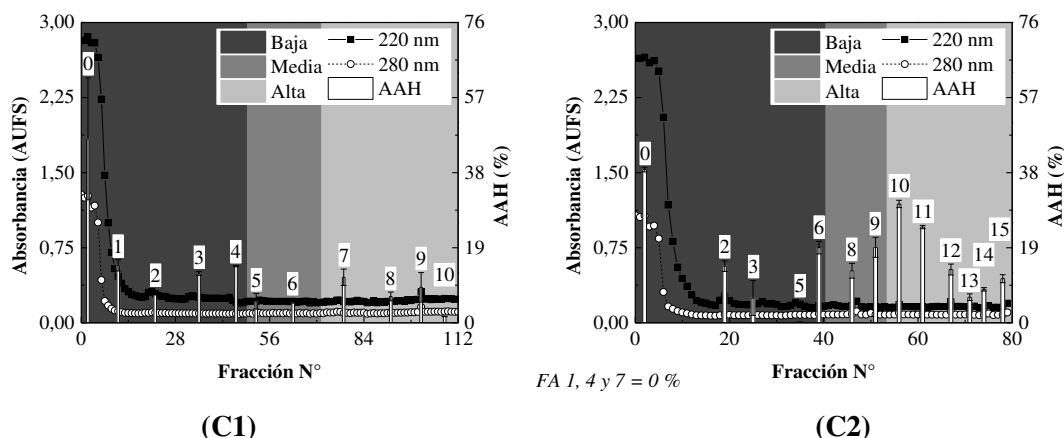
**(A2)**



**(B1)**



**(B2)**



**Figura 34.** Caracterización de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados por cromatografía de intercambio catiónico fuerte. (A) Proteína. (B) Actividad antioxidante (AAO). (C) Actividad antihipertensiva (AAH). (1) 22,1%. (2) 29,1%. Baja, Media, Alta: fuerza iónica del *buffer* de elución.

Al analizar ambas cromatografías aniónicas, se observan perfiles de elución similares (Figuras 32 y 33), sin embargo, en la IEC-Q desaparecen los picos con mayores tiempos de retención que se registraron en la IEC-DEAE. Estas pequeñas diferencias son esperables, ya que la fuerza de unión diferente de los intercambiadores afecta la retención de los compuestos. Los intercambiadores débiles, como el DEAE, tienden a retener compuestos con mayor carga, ya sea biológicamente activos o no, debido a sus grupos básicos débiles, a diferencia de los los intercambiadores fuertes, como el Q, que tienen grupos menos selectivos.

El estudio de la influencia de aminoácidos cargados sobre la bioactividad reveló resultados que coinciden con lo reportado en la bibliografía acerca de la composición de péptidos bioactivos (Kobayashi et al., 2008; Welderufael et al., 2012; Zou et al., 2016; Tondo et al., 2019), lo que sugiere que la carga de los péptidos es un factor determinante de la bioactividad.

La actividad antioxidante de un compuesto se refiere a su capacidad para proteger los sistemas biológicos contra los efectos nocivos de los procesos de oxidación, responsables del daño celular. El análisis del comportamiento de los péptidos con esta capacidad es complejo, ya que no existe una única forma de detectar sustancias antioxidantes ni un único mecanismo antioxidante para las sustancias bioactivas. El ensayo con el reactivo ABTS es una de las metodologías más efectivas y, por lo tanto, uno de las más comúnmente empleadas (Silva et al., 2006; Sah et al., 2018). Esta técnica mide la capacidad de un péptido o mezcla de péptidos (el potencial antioxidante) para transferir átomos de hidrógeno o electrones a un oxidante de manera rápida y sencilla. El estudio de la actividad captadora de radicales ABTS mostró que los péptidos con AAO estarían principalmente relacionados con residuos de aminoácidos ácidos y, en menor

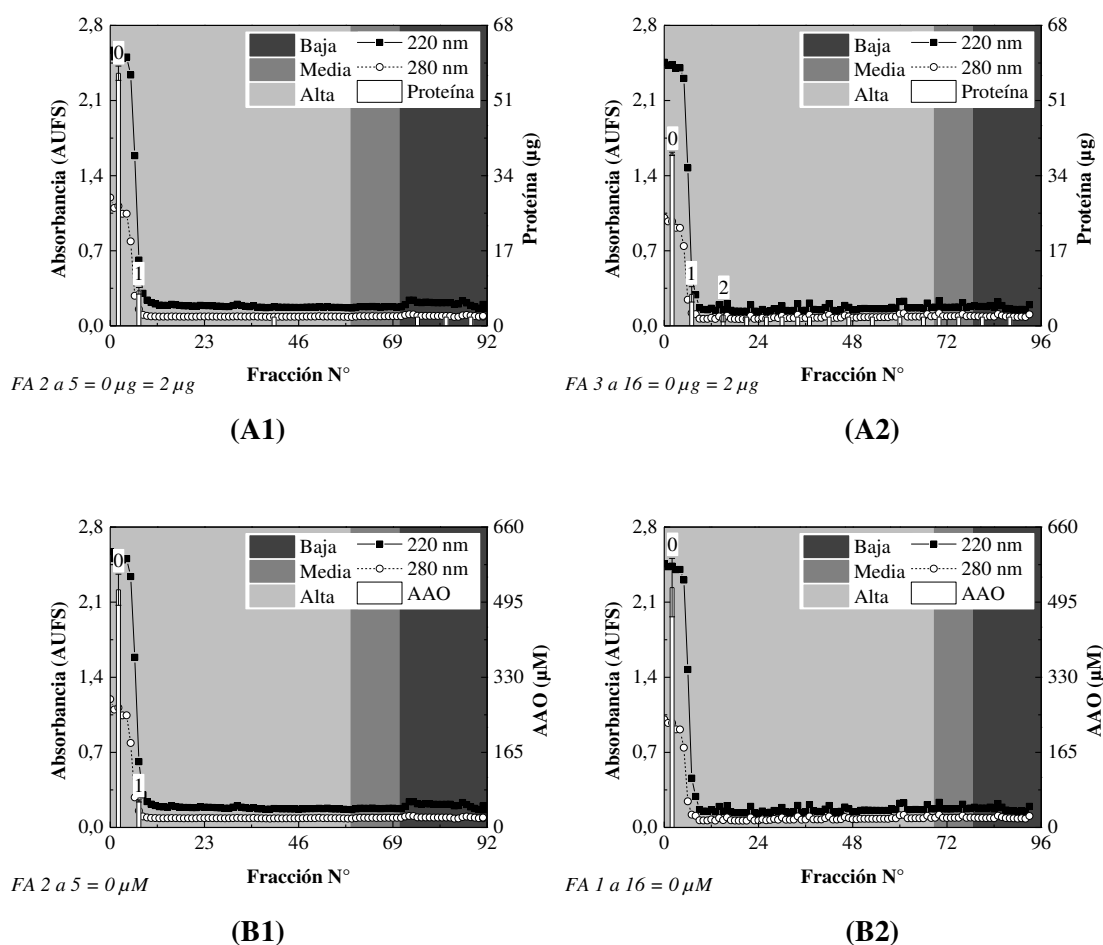
medida, con residuos básicos. Los aminoácidos ácidos cargados negativamente (ácido glutámico y ácido aspártico) han demostrado capacidad de extinguir radicales libres debido a la presencia de una cantidad significativa de electrones. Un ejemplo es el caso de los péptidos de colza sintetizados a partir de la fermentación con *Bacillus subtilis*, en los cuales el ácido glutámico fue uno de los aminoácidos predominantes dentro de la secuencia de los péptidos (Zou et al., 2016).

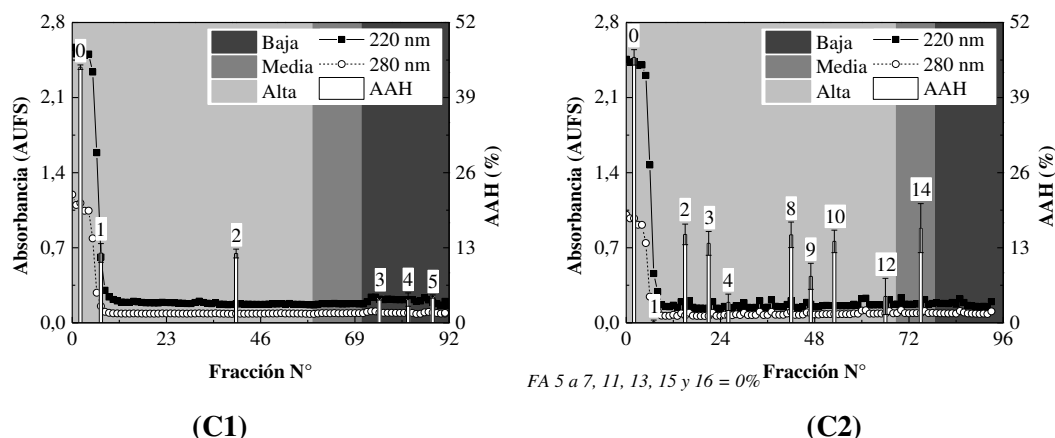
Por su parte, a la hora de evaluar la actividad antihipertensiva es crucial considerar el mecanismo de acción de la enzima involucrada en la regulación de la presión arterial. La acción de la enzima convertidora de angiotensina se produce mediante la escisión del dipéptido C-terminal de oligopéptidos (Tondo et al., 2019). Sus sustratos biológicos son el decapeptido angiotensina I y el nonapéptido bradiquina. Se ha destacado la importancia de las secuencias C-terminales de los péptidos inhibidores de la ECA al evaluar la unión de los péptidos hipuril-histidil-leucina e hipuril-fenilalanina-arginina, cuyos fragmentos C-terminales son similares a los de los sustratos biológicos (Welderufael et al., 2012). Al menos tres residuos interactúan con el sitio activo de la enzima, ejerciendo su efecto inhibitor. Los residuos de aminoácidos aromáticos hidrofóbicos (triptófano, fenilalanina, tirosina y prolina) son esenciales para una interacción eficiente y para la posterior inhibición del sitio catalítico de la ECA (Tondo et al., 2019). Kobayashi et al. (2008) evaluaron la influencia del tipo y la posición de los residuos de aminoácidos en el efecto inhibitor de la ECA de diferentes péptidos sintetizados. Informaron que la mayoría de los péptidos inhibidores contienen un residuo cargado positivamente (lisina, histidina o arginina) en el extremo C-terminal, junto con un residuo aromático. El residuo cargado interactúa con un residuo negativo cerca del sitio activo de la enzima, mientras que el residuo aromático bloquea estéricamente el sitio activo. Este mecanismo explica el aumento de las fracciones antihipertensivas con mayor retención al emplear la cromatografía de intercambio catiónico. Además, se ha reportado que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos o residuos de prolina en el extremo C-terminal contribuyen a potentes efectos inhibitorios y, a su vez, a la resistencia a la digestión, lo que representa un atributo beneficioso (Chamata et al., 2020). En cuanto a los residuos carboxílicos, Tondo et al. (2019) informaron que su presencia es poco favorable para la inhibición de la ECA. Sin embargo, hemos detectado la existencia de péptidos con estas características.

#### 4.2.2.2.3. Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica permitió fraccionar los hidrolizados según su hidrofobicidad. Mediante esta técnica se obtuvieron 91 y 93 fracciones a partir del WPH-22 y del WPH-29, respectivamente. Estas fracciones se agruparon en función del perfil de elución, resultando en 6 FA para el WPH-22 (0 a 5) y 17 FA para el WPH-29 (0 a 16).

El contenido proteico y la bioactividad de cada fracción agrupada se muestran en la **Figura 35 (Tabla A5.5, Anexo 5)**. A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que la FA-0 de ambos hidrolizados presentó los valores más altos en las características evaluadas, alcanzando  $57,18 \pm 1,61 \mu\text{g}$  de proteína,  $522,24 \pm 34,16 \mu\text{M}$  de Trolox y  $44,27 \pm 0,38\%$  para el WPH-22 y  $38,93 \pm 0,37 \mu\text{g}$  proteína,  $526,97 \pm 64,19 \mu\text{M}$  de Trolox y  $45,96 \pm 1,34\%$  para el WPH-29. Es importante recordar que la FA-0 corresponde a la muestra final después de la recirculación en la columna para la adsorción de los péptidos en la fase estacionaria, lo que implica que incluye todos los compuestos que no fueron retenidos por la resina. Con un contenido proteico menor, la FA-0 del WPH-29 mostró bioactividades estadísticamente iguales a la FA-0 del WPH-22. Esta estrategia cromatográfica resulta interesante, ya que permite eliminar sustancias relativamente hidrofóbicas responsables del sabor amargo de los hidrolizados de las proteínas del suero lácteo. Cabe destacar, además, que la FA-0 del WPH-29 fue la única FA que presentó efectos antioxidantes; y, en el caso del WPH-22, la única FA distinta a la FA-0 que mostró estos efectos fue la FA-1. En relación a la AAH, las fracciones distintas a la FA-0 que presentaron porcentajes inhibidores de la ECA entre el 12% y el 16% fueron las FA 1 y 2 del WPH-22 y las FA 2, 3, 8, 10 y 14 del WPH-29. Estos resultados sugieren que los péptidos hidrofóbicos no serían responsables de la AAO observada en los hidrolizados, pero sí de la AAH.





**Figura 35.** Caracterización de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados por cromatografía interacción hidrofóbica. (A) Proteína. (B) Actividad antioxidante (AAO). (C) Actividad antihipertensiva (AAH). (1) 22,1%. (2) 29,1%. Baja, Media, Alta: fuerza iónica del *buffer* de elución.

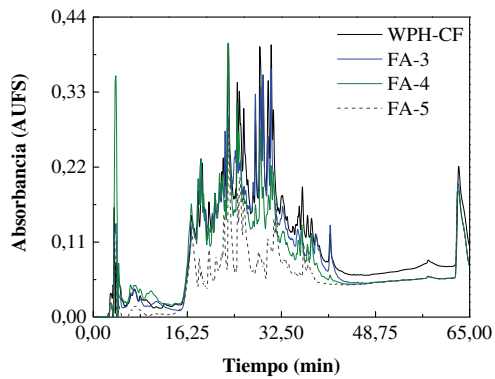
Como se mencionó en la **sección 4.2.2.2.2**, la actividad inhibidora de la ECA está relacionada a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos, los cuales facilitan una interacción eficiente y, cuando éstos son aromáticos, bloquean estéricamente el sitio activo de la enzima (Saito et al., 1994; Welderufael et al., 2012; Tondo et al., 2019). Este comportamiento sugiere que los péptidos inhibidores de la ECA tienen una mayor naturaleza hidrofóbica en comparación con los péptidos antioxidantes. Sin embargo, varios péptidos antioxidantes también presentaron características hidrofóbicas, ya que fueron ligeramente retenidos en presencia de 3,5 M de NaCl, pero rápidamente eluidos y recuperados en la fracción pasante. Estas diferencias en la retención en la resina podrían atribuirse al ligando utilizado en la HIC.

*Phenyl-Sepharose* es un adsorbente que interactúa con anillos aromáticos de los residuos de aminoácidos en la superficie de un péptido (Gelsema et al., 1980). De esta manera, se espera que la presencia de aminoácidos aromáticos en los péptidos bioactivos favorezca su retención en la columna cromatográfica. De acuerdo a los resultados obtenidos, los péptidos con AAH deberían ser ricos en aminoácidos aromáticos en detrimento de los péptidos con AAO. Estos últimos deberían contener en mayor proporción aminoácidos hidrofóbicos de cadena alquílica, como isoleucina y valina, lo que explicaría la escasa interacción con una resina que contiene un ligando aromático. Aunque podrían existir interacciones puramente hidrofóbicas, estas no serían suficientes para retener eficientemente los péptidos antioxidantes debido a la ausencia de interacciones aromáticas.

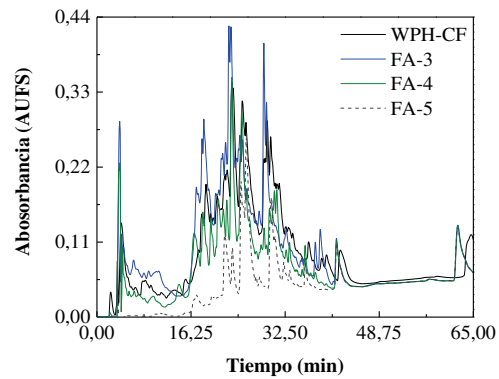
4.2.2.2.4. RP-HPLC

El análisis de la RP-HPLC de las FA con mayor bioactividad obtenidas reveló la complejidad de las fracciones aisladas (**Figura 36**). Se observó que la actividad funcional detectada se debe a la presencia de varios compuestos peptídicos, comprendidos entre los 16,25 y 48,75 min de elución, a excepción de algunos casos como por ejemplo la FA-3 del WPH-22 obtenida con la IEC-DEAE o la FA-10 del WPH-29 de la IEC-SP. En esos casos se logró una purificación interesante, ya que el cromatograma evidenció pocos picos.

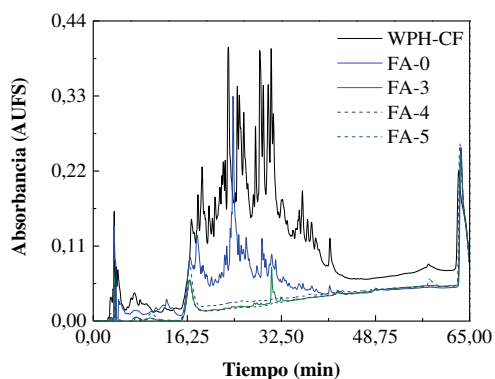
Tal como se mencionó en la **sección 4.2.2.2**, los perfiles de los hidrolizados presentan diferencias visuales al comparar los DH obtenidos, como se observa en las FA 3 y 5 de la GFC, dentro del rango de elución de 25 a 35 min. En este caso, se aprecia la desaparición de ciertos picos al aumentar el DH, lo que sugiere modificaciones estructurales en los péptidos.



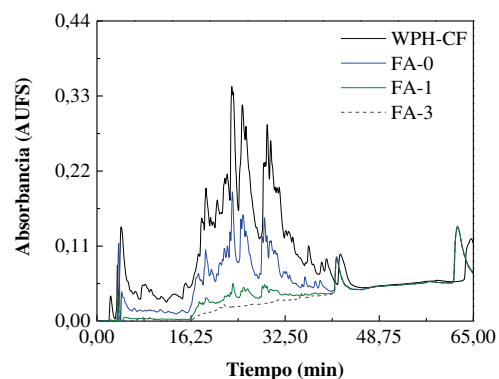
(A1)



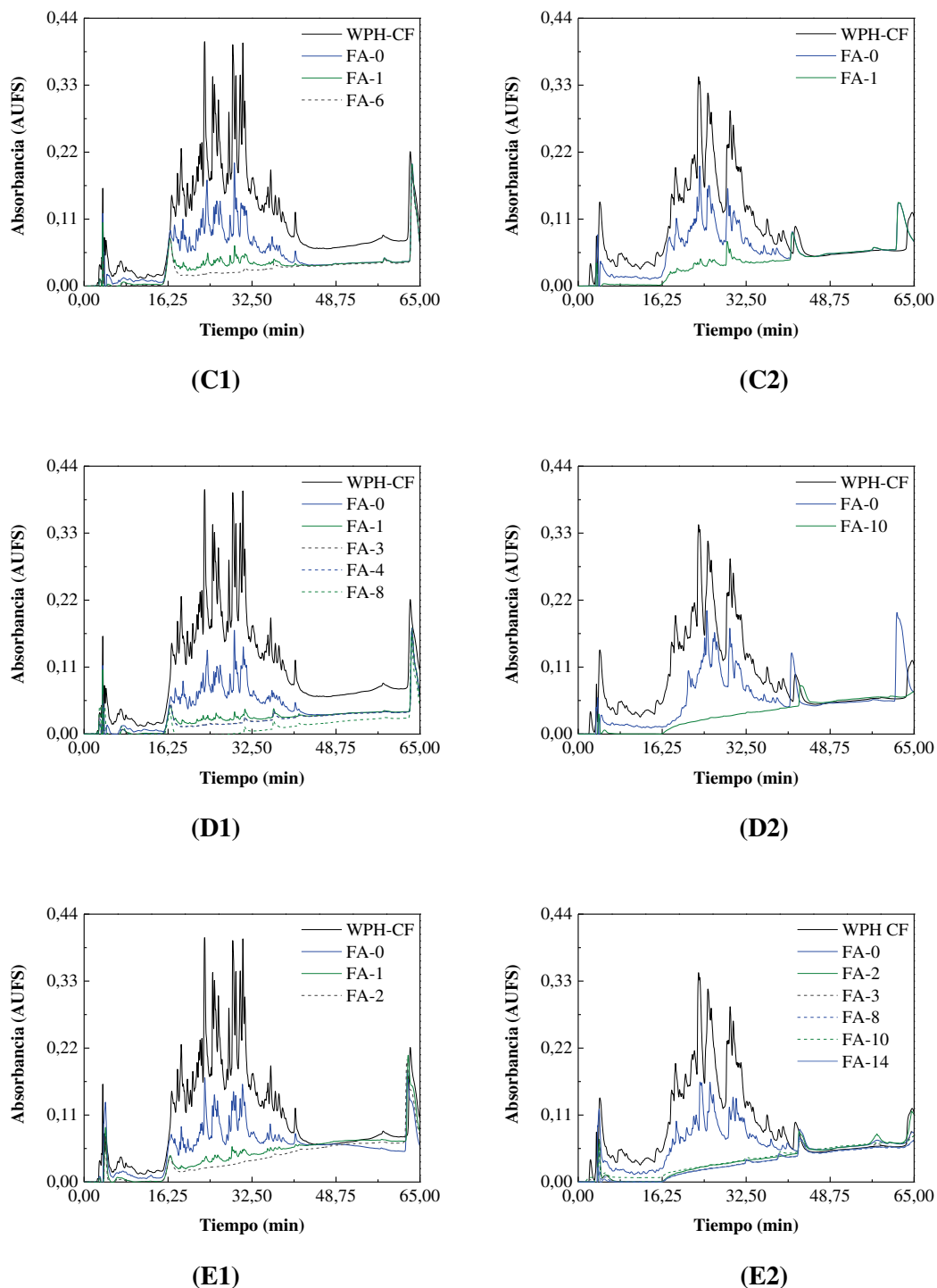
(A2)



(B1)



(B2)



**Figura 36.** Análisis RP-HPLC de las fracciones agrupadas (FA) de las técnicas cromatográficas con mayor bioactividad. (A) Cromatografía de filtración en gel. (B) Cromatografía de intercambio aniónico débil. (C) Cromatografía de intercambio aniónico fuerte. (D) Cromatografía de intercambio catiónico fuerte. (E) Cromatografía de interacción hidrofóbica. (1) 22,1%. (2) 29,1%.

En comparación con la HIC, en este caso se observó una mayor retención de los compuestos peptídicos, lo que sugiere la existencia de residuos hidrofóbicos en su composición. Esta retención está principalmente determinada por la alta afinidad de los residuos aromáticos

como triptofano, fenilalanina y tirosina, hacia la fase estacionaria en RP-HPLC, y en menor medida, a los residuos alifáticos de cadena ramificada, como valina, leucina e isoleucina (Gelsema et al., 1980). Estos resultados coinciden con lo expuesto en la **sección 4.2.2.2.2**, donde se menciona que la actividad inhibitoria de la ECA en péptidos depende la presencia de residuos hidrofóbicos y aromáticos (Saito et al., 1994; Kobayashi et al., 2008; Pan et al., 2012).

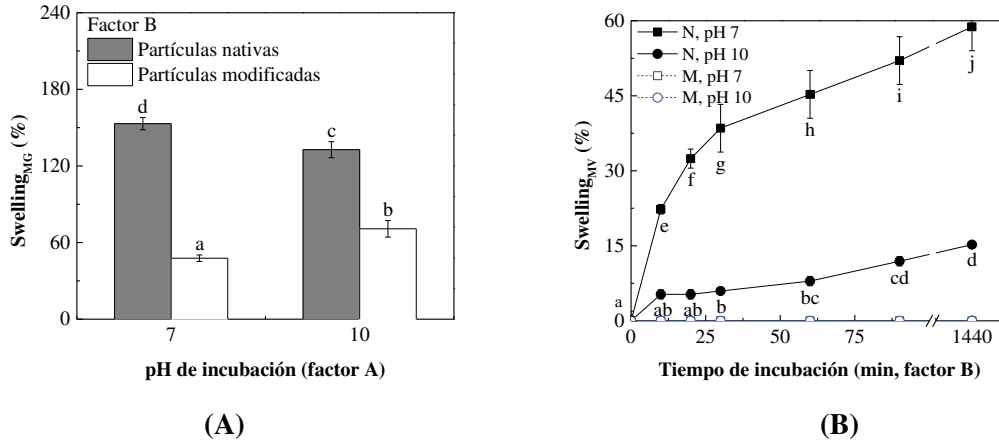
### **4.3. Estudios de inmovilización**

#### **4.3.1. Caracterización de las partículas**

La caracterización preliminar de las partículas de quitosano incluyó estudios de hinchamiento, tamaño y forma, lo cual permitió obtener una primera aproximación a las propiedades morfológicas de los materiales sintetizados.

La capacidad de hinchamiento (*swelling*) de las partículas, tanto sin modificar como modificadas con glutaraldehído al 1%, se evaluó empleando dos metodologías: gravimétrica y volumétrica. Los resultados obtenidos a partir de ambos métodos se muestran en la **Figura 37**. Desde el punto de vista gravimétrico, se observó que el incremento del pH de condiciones neutras a alcalinas (pH 7 a 10) provocó una disminución de la capacidad de hinchamiento de las partículas nativas, evidenciada por una menor masa tras 24 h de incubación (**Figura 37.A**). En cambio, en las partículas modificadas con glutaraldehído, el aumento del pH condujo a un incremento en el valor de hinchamiento medido. No obstante, la modificación con glutaraldehído redujo el *swelling* de las partículas a pH 7 y 10 en comparación con las partículas nativas. Este comportamiento puede explicarse por la naturaleza catiónica del quitosano, cuya capacidad de hinchamiento está influenciada por el pH del medio y por la presencia y densidad del agente reticulante: a pH neutro o básico, los grupos amino (-NH<sub>2</sub>) no se protonan, lo que reduce su interacción con el agua y, en consecuencia, su capacidad de hinchamiento. Esta limitación se acentúa cuando el quitosano se modifica con glutaraldehído, ya que la reticulación incrementa la rigidez de la red polimérica, aunque mejora la estabilidad estructural del hidrogel (Torğut et al., 2022; Kaçoğlu et al., 2024).

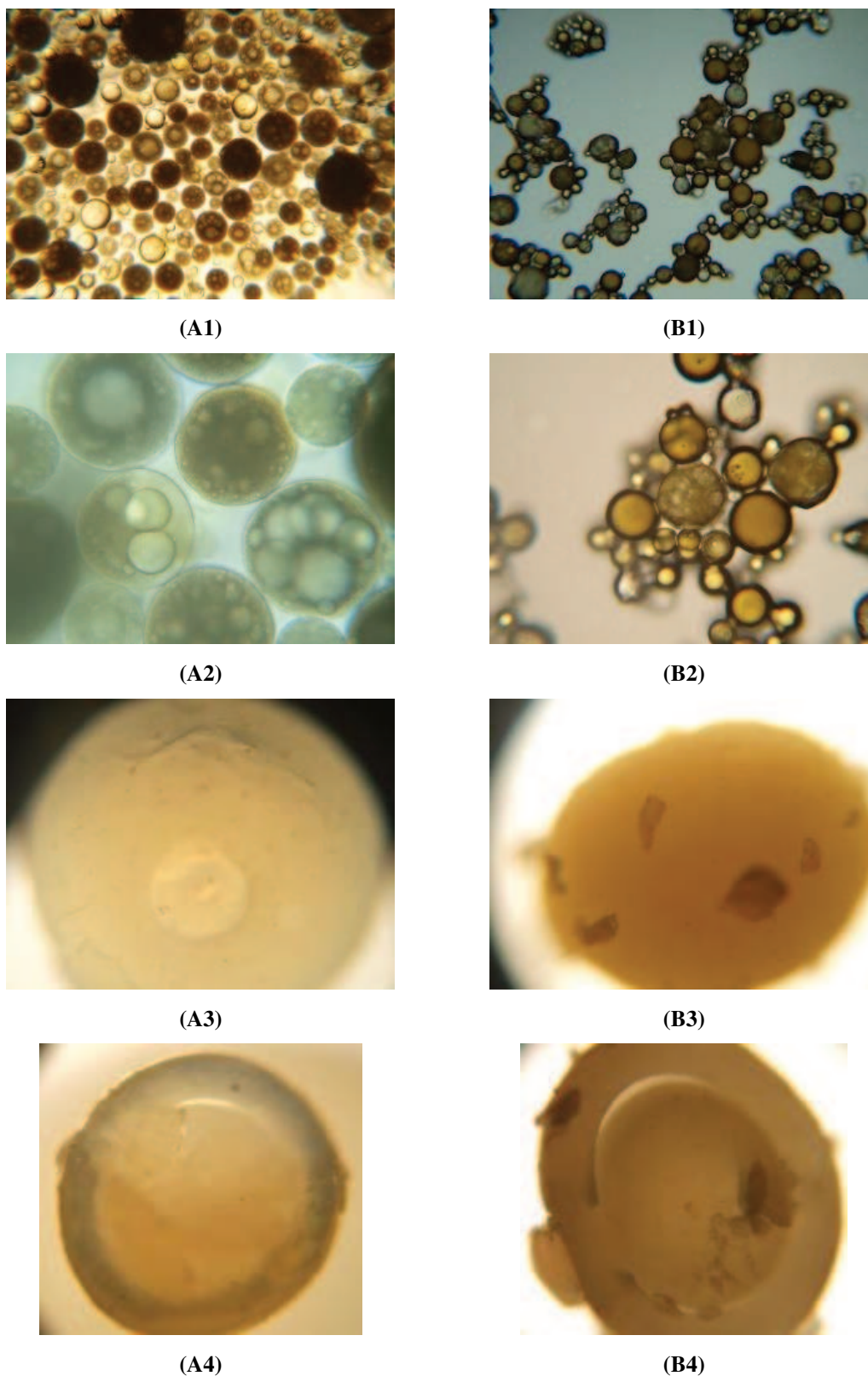
Desde el punto de vista volumétrico (**Figura 37.B**), también se evidenció una disminución de la capacidad de hinchamiento de las partículas nativas al aumentar el pH de 7 a 10, en todos los tiempos evaluados (0 a 1440 min). A pH 7, el *swelling* mostró un incremento progresivo con el tiempo, alcanzando un valor máximo de 58,78±4,78%. En cambio, a pH 10, el aumento fue mucho más moderado, con un valor final de 15,23±0,00%. En cuanto al efecto del glutaraldehído, se observó que la modificación covalente de las partículas tuvo un impacto negativo sobre su capacidad de hinchamiento, según los resultados obtenidos en los ensayos volumétricos. En todos los tiempos evaluados y a ambos valores de pH, las alturas registradas fueron menores a la inicial, lo que indica una pérdida de la capacidad de hinchamiento.



**Figura 37.** Capacidad de hinchamiento (*swelling*) de las partículas de quitosano, según el método gravimétrico (A) y volumétrico (B). N: partículas nativas. M: partículas modificadas. Resultados del ANOVA de múltiples vías: -figura (A): •factor A: NS; •factor B e interacción AB: \*; -figura (B): •factores A (pH de incubación) y B e interacción AB: \*; -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); -letras diferentes, dentro de cada figura (A o B), indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la bibliografía se han reportado comportamientos tanto similares como distintos respecto al efecto del pH sobre la propiedad de hinchamiento del quitosano, así como sobre el uso de diferentes agentes reticulantes (Pavoni et al., 2021; Raju et al., 2021; Torğut et al., 2022; Kaçoğlu et al., 2024). Estos estudios muestran que la reticulación con dichos compuestos afecta de manera compleja la capacidad de hinchamiento del quitosano, y que esos efectos están fuertemente influenciados por el pH del medio. Mientras que en los estudios de la bibliografía se usaron principalmente métodos gravimétricos, el presente trabajo también incluyó un análisis volumétrico, lo que proporcionó una perspectiva más amplia sobre el hinchamiento del quitosano.

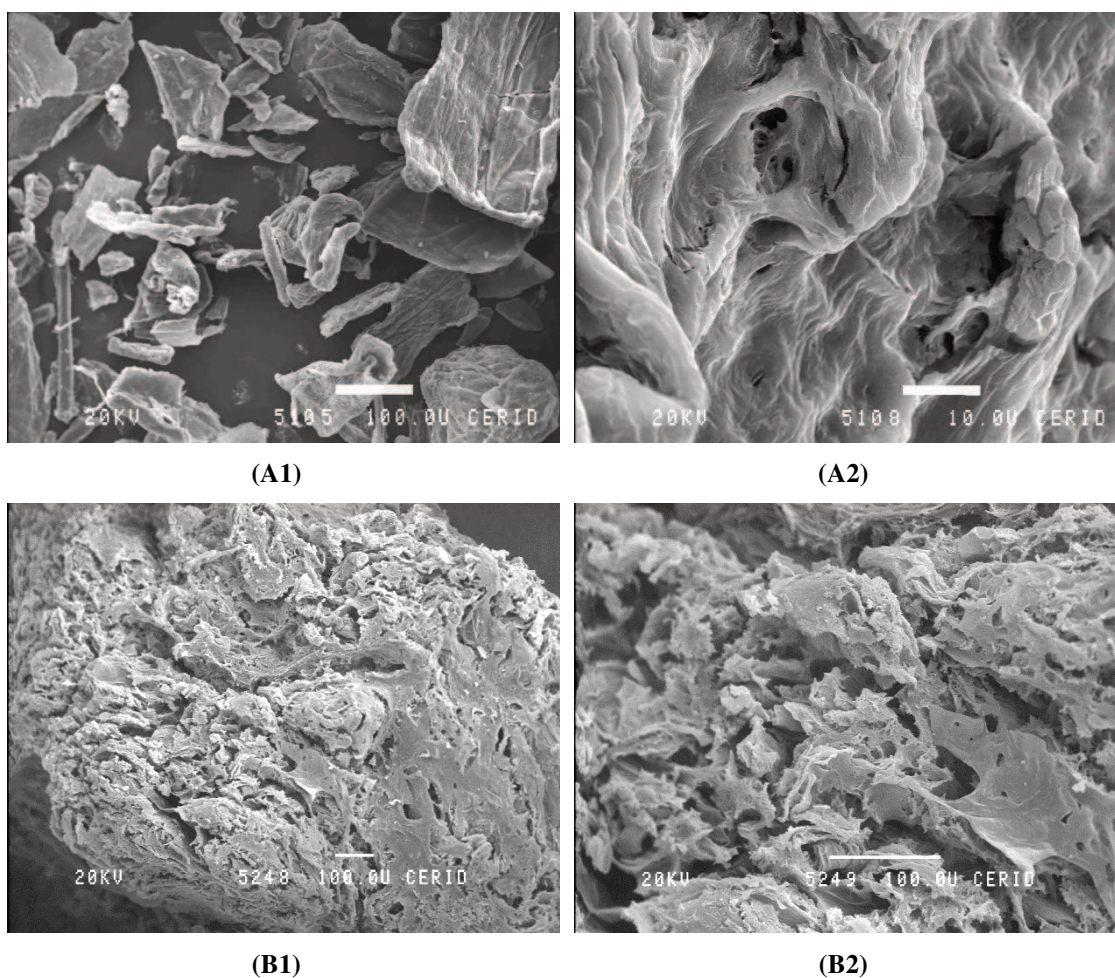
Las imágenes obtenidas a partir del análisis con microscopía óptica de las partículas tanto sin modificar como modificadas con glutaraldehído se muestran en la **Figura 38**. Este análisis permitió observar las características macroscópicas de las mismas, como su tamaño, forma y color. Es posible apreciar que tanto las partículas de quitosano nativo como las modificadas presentan una morfología preferentemente esférica o redondeada, con un tamaño que oscila entre 1 y 1,5  $\mu\text{m}$ . Sin embargo, se evidencian diferencias importantes tras la modificación con glutaraldehído. Las partículas tratadas muestran una coloración más oscura y una superficie aparentemente más lisa, lo que sugiere un aumento en la rigidez estructural.



**Figura 38.** Microscopía óptica de partículas de quitosano sin modificar (A) y modificadas con glutaraldehído (B). (1)  $\times 4$ . (2)  $\times 20/\times 10$ . (3) partícula entera. (4) corte.

Las partículas no sólo se analizaron mediante microscopía óptica sino también a través de microscopía electrónica de barrido (**Figura 39**). Este análisis permitió visualizar la morfología

superficial de las partículas, observándose estructuras con bordes irregulares y superficies relativamente lisas en las partículas nativas (**Figura 39.A**), aunque con presencia de fracturas y cierta rugosidad superficial. En cambio, las partículas de quitosano modificadas con glutaraldehído (**Figura 39.B**) mostraron una morfología más densa y compacta, con una superficie significativamente más rugosa, porosa y con mayor número de cavidades. Estos cambios morfológicos evidencian el efecto del entrecruzamiento con glutaraldehído, lo cual sugiere una reorganización de la matriz polimérica que contribuye a una mayor rigidez y compactación estructural de la partícula.



**Figura 39.** Microscopía electrónica de barrido de partículas de quitosano sin modificar (**A, 1:** 300×, **2:** 3000×) y modificadas con glutaraldehído (**B, 1 y 2:** 300×).

Los resultados obtenidos se compararon con antecedentes bibliográficos que analizaron la morfología del quitosano bajo diversas condiciones (Genta et al., 1998; Monteiro Jr. & Airoidi, 1999; Campos et al., 2013; Li et al., 2013; Raju et al., 2021; da Silva Melo et al., 2023). Estos estudios reportaron, al igual que el presente trabajo, una morfología esférica y de superficie lisa en quitosano sin modificar, mientras que otros describieron características adicionales como

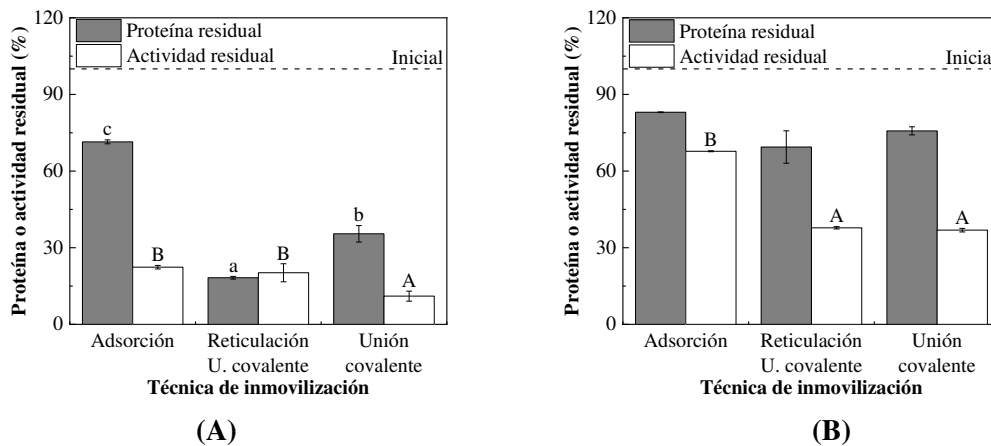
flexibilidad y cristalinidad homogénea. En cuanto a la modificación con glutaraldehído, se observó, de manera similar a lo observado en este trabajo, que generaba morfologías más rugosas y porosas. Además, se evidenció que distintos agentes entrecruzantes inducen patrones morfológicos específicos, dependiendo de su estructura química y grado de rigidez.

#### 4.3.2. Proceso de inmovilización

La inmovilización de las *Alcalase*® y *Flavourzyme*® se realizó en tres etapas: en la primera, se evaluaron distintas técnicas de inmovilización (adsorción, unión covalente, reticulación-unión covalente). En la segunda, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de agente activante (0,05; 1 y 2%) sobre la inmovilización enzimática. En la tercera, se evaluó el efecto del tiempo sobre la inmovilización de las enzimas. En cada etapa, se midió el contenido proteico y/o la actividad de las muestras obtenidas.

##### 4.3.2.1. Evaluación de distintas técnicas de inmovilización

La inmovilización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® sobre quitosano, utilizando distintas técnicas, se visualiza en la **Figura 40** como proteína residual y actividad residual, y los parámetros de inmovilización calculados a partir de estos resultados se detallan en la **Tabla 12**.



**Figura 40.** Inmovilización de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) mediante distintas técnicas, expresada como proteína residual y actividad residual. Resultados del ANOVA: -letras minúsculas (proteína residual) o mayúsculas (actividad residual) diferentes, para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ); -la ausencia de letras indica que no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

En cuanto a la proteína residual, la inmovilización por reticulación seguida de unión covalente mostró los valores más bajos en la insolubilización de *Alcalase*®, mientras que en *Flavourzyme*® no se encontraron diferencias significativas entre esta técnica y la inmovilización covalente, evidenciando ambas los valores más bajos. Esto resultados se vieron reflejados en el

rendimiento de inmovilización en términos de proteína, siendo la inmovilización por reticulación- unión covalente la que presentó el mejor rendimiento en *Alcalase*®, mientras que en *Flavourzyme*® los valores más altos se encontraron tanto en la inmovilización por reticulación- unión covalente como en la inmovilización covalente.

En términos de actividad residual, la inmovilización covalente registró los valores más bajos para *Alcalase*®, mientras que en *Flavourzyme*® se observó un comportamiento similar al registrado en los resultados de proteína residual: tanto la inmovilización por reticulación- unión covalente como la inmovilización covalente presentaron los valores más bajos de actividad residual en el sobrenadante. Para el rendimiento de inmovilización en términos de actividad, en *Alcalase*® no se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos, si bien la inmovilización covalente mostró el valor más alto. Mientras que en *Flavourzyme*®, las inmovilizaciones por reticulación- unión covalente y por unión covalente registraron los valores más altos. En cuanto a la actividad teórica específica y la actividad teórica equivalente, la inmovilización por adsorción fue la que presentó los valores más altos en *Alcalase*®, mientras que en *Flavourzyme*® los valores más altos se registraron en la inmovilización covalente.

**Tabla 12.** Parámetros de inmovilización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® inmovilizadas mediante distintas técnicas.

Enzima	Técnica de inmovilización	$\eta_p$ (%)	$\eta_a$ (%)*	AE (UI/mg) <sup>+</sup>	AE <sub>q</sub> (%)
<i>Alcalase</i> ®	1	25,57±4,43 <sup>a</sup>	74,76±2,70	12,20±0,44 <sup>c</sup>	292,35±10,56 <sup>b</sup>
	2	81,76±0,95 <sup>c</sup>	77,99±16,53	0,41±0,09 <sup>a</sup>	95,40±20,22 <sup>a</sup>
	3	64,55±1,76 <sup>b</sup>	87,02±1,55	5,62±0,10 <sup>b</sup>	134,82±2,40 <sup>a</sup>
<i>Flavourzyme</i> ®	1	16,95±2,38 <sup>a</sup>	32,24±0,45 <sup>a</sup>	6,43±0,09 <sup>a</sup>	190,19±2,65 <sup>a</sup>
	2	30,59±0,85 <sup>b</sup>	62,20±7,46 <sup>b</sup>	6,30±0,76 <sup>a</sup>	203,36±24,40 <sup>a</sup>
	3	24,25±2,69 <sup>b</sup>	63,12±0,38 <sup>b</sup>	8,73±0,05 <sup>b</sup>	260,25±1,58 <sup>b</sup>

Letras diferentes, dentro de cada columna para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\* La ausencia de letras, dentro de cada columna para cada enzima, indica que no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Técnicas de inmovilización: 1. Inmovilización por adsorción; 2. Inmovilización por reticulación y unión covalente; 3. Inmovilización por unión covalente.

<sup>+</sup> Actividad específica expresada como UI en mg de *Alcalase*®, en el caso de *Alcalase*® y UI en mg de albúmina sérica bovina, en el caso de *Flavourzyme*®.

En resumen, entre las distintas técnicas empleadas, la inmovilización por reticulación seguida de unión covalente mostró los menores valores de proteína residual y el mayor rendimiento de inmovilización, tanto para *Alcalase*® como para *Flavourzyme*®, sin presentarse, en el caso de *Flavourzyme*®, diferencias significativas con la inmovilización covalente. En términos de actividad, la inmovilización covalente fue la que presentó los mejores resultados para *Alcalase*®, mientras que para *Flavourzyme*®, los mejores resultados se dieron entre la inmovilización covalente y la inmovilización por reticulación seguida de unión covalente. En cuanto a la actividad teórica específica y la actividad teórica equivalente, que consideran tanto la proteína como la actividad, la inmovilización por adsorción evidenció los valores más altos entre las técnicas evaluadas en el caso de *Alcalase*®, y la inmovilización por unión covalente en el caso de *Flavourzyme*®.

Los resultados teóricos obtenidos a partir de la actividad determinada en sobrenadantes y lavados coincidieron con la actividad práctica de los derivados (**Tabla 13**). El derivado obtenido por unión covalente, en el caso de *Alcalase*®, y por reticulación-unión covalente en el caso de *Flavourzyme*® fueron los que mostraron la mayor actividad práctica, lo que concuerda con la menor actividad residual registrada en los sobrenadantes. Sin embargo, los resultados obtenidos con *Flavourzyme*® deben interpretarse con cautela, ya que la actividad práctica fue considerablemente baja, lo que sugiere que las diferencias observadas podrían deberse a la presencia de precipitados en suspensión, más que a una variación real en la actividad de los biocatalizadores (Qualls et al., 1983). Esta caída en la actividad práctica podría también estar asociada a un carácter potencialmente multimérico de la enzima, estructura que se vería fuertemente comprometida durante el proceso de inmovilización.

**Tabla 13.** Actividad práctica de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® inmovilizadas mediante distintas técnicas.

Técnica de inmovilización	Actividad total (UI)	
	<i>Alcalase</i> ®	<i>Flavourzyme</i> ®
Adsorción	0,64±0,00 <sup>a</sup>	0,29±0,01 <sup>a</sup>
Reticulación-Unión covalente	4,63±0,31 <sup>b</sup>	0,37±0,03 <sup>b</sup>
Unión covalente	18,63±0,68 <sup>c</sup>	0,27±0,02 <sup>a</sup>

Letras diferentes, dentro de cada columna, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La actividad práctica de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® inmovilizadas se determinó con 8 ml de caseína 10 mg/ml y 0,3 g o 0,6 g de enzima inmovilizada, respectivamente.

En otros estudios también se evaluaron distintas técnicas de inmovilización de estas enzimas, reportando resultados similares. La menor actividad observada en la inmovilización por

reticulación se asoció a una reticulación no controlada entre las moléculas de enzima y glutaraldehído, lo que dio lugar a la formación de agregados con propiedades mecánicas inadecuadas (Žuža et al., 2017). Por otro lado, la inmovilización covalente mostró menor actividad enzimática en comparación con el entrapamiento, pero a cambio presentó mayor eficiencia de carga y estabilidad (Hansupalak et al., 2010).

En cuanto a los controles (**Tabla 14**), se observó una reducción en la actividad enzimática en comparación con la actividad inicial. Al comparar los controles de adsorción (enzima en *buffer*) con aquellos que involucraron el agente activante, se evidenció que este último tuvo un efecto negativo sobre las enzimas, reduciendo la actividad a menos del 30% del valor inicial en *buffer*. El glutaraldehído podría estar afectando la estructura de las enzimas, ocasionando su inactivación (Migneault et al., 2004; Barbosa et al., 2014).

**Tabla 14.** Actividad residual de los controles de inmovilización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® realizada mediante distintas técnicas.

Técnica de inmovilización	Actividad residual (%)	
	<i>Alcalase</i> ®	<i>Flavourzyme</i> ®
Adsorción <sup>+</sup>	68,43±2,66 <sup>b</sup>	70,62±5,83 <sup>b</sup>
Reticulación-Unión covalente	11,60±5,96 <sup>a</sup>	33,32±1,17 <sup>a</sup>
Unión covalente	7,79±2,56 <sup>a</sup>	22,10±6,97 <sup>a</sup>

Control de adsorción: solución de enzima [preparada en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8)] incubada por 22 h en condiciones de inmovilización y en ausencia de quitosano.

Control de reticulación-unión covalente: solución de *Alcalase*® o *Flavourzyme*® [preparada en solución de glutaraldehído 0,2 o 0,004% (v/v), respectivamente] incubada por 44 h en condiciones de inmovilización y en ausencia de quitosano.

Control de unión covalente: solución de *Alcalase*® o *Flavourzyme*® [preparada en solución de glutaraldehído 1 o 0,2% (v/v)] incubada por 22 h en condiciones de inmovilización y en ausencia de quitosano.

Actividad residual calculada tomando como 100% la actividad de la solución de enzima en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8), pre-incubada durante 2 h a temperatura ambiente, en el caso de la inmovilización por adsorción y por unión covalente, y la actividad de la solución de enzima en glutaraldehído 0,2 o 0,004% (v/v) sin incubación, en el caso de la inmovilización por reticulación y unión covalente.

<sup>+</sup> El control de adsorción también cuenta como control en *buffer* de la inmovilización por unión covalente ya que requirió los mismos tiempos de incubación.

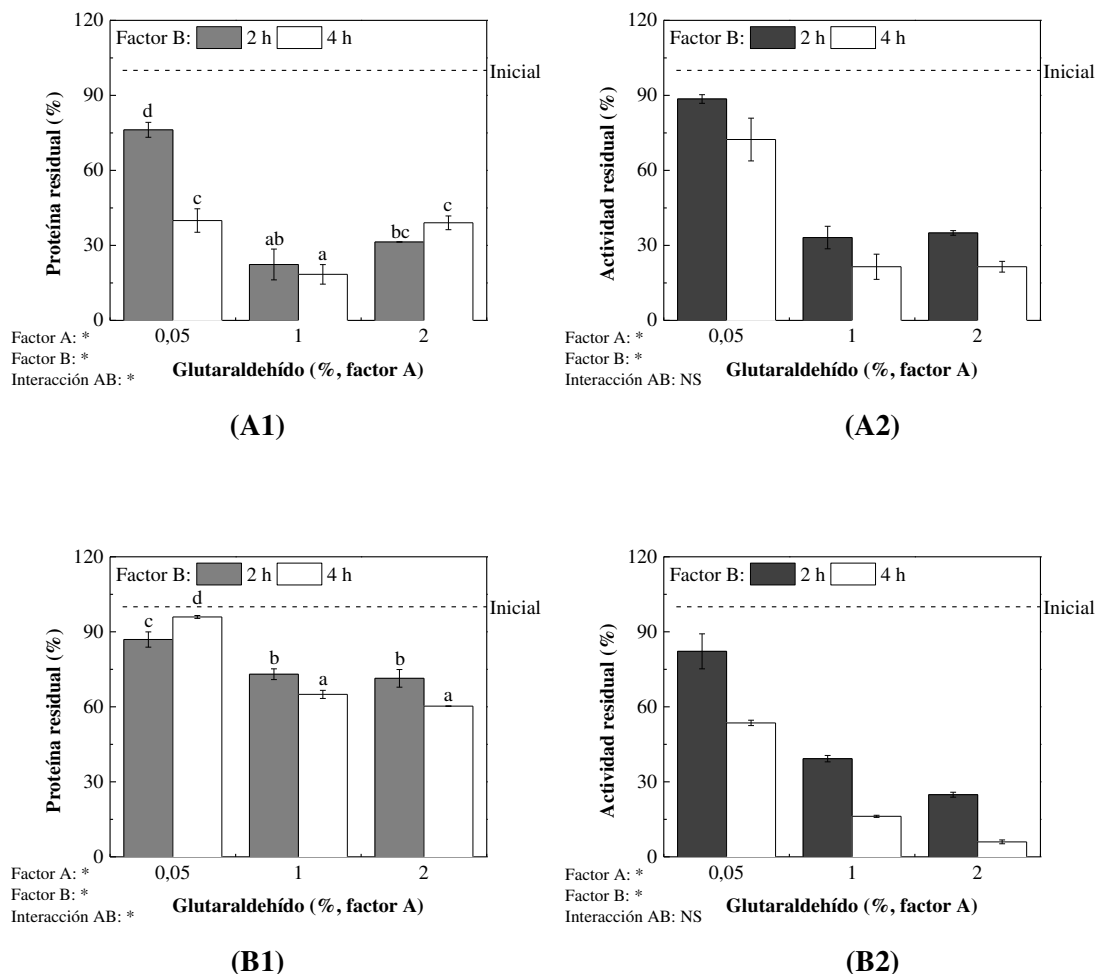
Dado que los derivados enzimáticos se utilizarán para la hidrólisis de concentrado de proteínas de suero lácteo, la actividad enzimática retenida tras la inmovilización fue el criterio

principal para su selección. Por ello, se optó por la inmovilización covalente, ya que esta técnica presentó valores de actividad residual entre los más bajos, junto con un rendimiento de inmovilización y actividades específica y equivalente adecuados, tanto para *Alcalase*® como para *Flavourzyme*®. Además, la inmovilización covalente suele conferir mayor estabilidad térmica y operacional, lo que resulta beneficioso en aplicaciones industriales donde las enzimas están expuestas a condiciones variables de temperatura, pH y reutilización en ciclos sucesivos. Esta estabilidad adicional podría prolongar la vida útil de los derivados enzimáticos y mejorar su eficiencia en procesos de hidrólisis a gran escala (Hong et al., 2008; Kujawa et al., 2021; Xu et al., 2023).

#### *4.3.2.2. Evaluación de la influencia de distintas concentraciones de agente activante*

La inmovilización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® sobre quitosano activado con distintas concentraciones de glutaraldehído se visualiza en la **Figura 41** como proteína residual y actividad residual, y los parámetros de inmovilización calculados a partir de estos resultados se detallan en las **Tablas 15 y 16**.

Los resultados de proteína residual obtenidos con *Alcalase*® demuestran que, a la menor concentración de glutaraldehído, el incremento del tiempo de inmovilización condujo a un aumento de la enzima inmovilizada. Sin embargo, a mayores concentraciones del agente activante, no se observaron cambios significativos en el contenido proteico al incrementar el tiempo de inmovilización. Por otro lado, se apreció que el incremento del 1 al 2% en la concentración de glutaraldehído al realizar la activación de los soportes para lograr obtener sus correspondientes derivados inmovilizados durante 4 h de inmovilización, produjo una disminución de *Alcalase*® inmovilizada (mayor proteína residual), efecto que es diferente al que se observó al incrementar la concentración de 0,05 a 1% a ambos tiempos de inmovilización evaluados. Estos resultados, que a su vez se ven reflejados en el rendimiento de inmovilización calculado a partir de la proteína incorporada, indicarían que los mejores derivados son aquellos obtenidos con quitosano activado con glutaraldehído al 1% (v/v). El incremento de la concentración de agente activante (de 1 a 2%), por un lado, no implicó un cambio significativo a las 2 h de inmovilización y, por otro lado, ocasionó una reducción del rendimiento de inmovilización a las 4 h de incubación, efecto que también se observó al reducir la concentración de agente activante a 0,05%, tanto a las 2 h como a las 4 h de inmovilización.



**Figura 41.** Inmovilización de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) sobre partículas de quitosano activadas con distintas concentraciones de glutaraldeído, expresada como proteína residual (1) y actividad residual (2). Resultados del ANOVA: -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); - letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Teniendo en cuenta los resultados de actividad residual, es posible indicar que el tiempo de inmovilización afectó la actividad de manera estadísticamente significativa reduciéndola, mientras que, la concentración del agente activante, presentó dicho efecto sólo al aumentar su concentración de 0,05 a 1%. Este comportamiento repercutió en el rendimiento de inmovilización en términos de actividad. En función de estos resultados, los derivados obtenidos luego de 4 h de inmovilización y con partículas activadas al 1 o 2% serían los candidatos adecuados para los próximos ensayos. No obstante, al evaluar los resultados teniendo en cuenta tanto los valores de actividad como los de proteína, mediante la actividad teórica específica y la actividad teórica equivalente, fue posible definir entre uno de los dos porcentajes de glutaraldeído mencionados. El derivado obtenido a partir de partículas de quitosano activadas con un 2% (v/v) de glutaraldeído fue el que presentó los mayores valores de actividad teórica específica y actividad teórica equivalente, en comparación con las demás condiciones evaluadas.

## Resultados y discusión

**Tabla 15.** Parámetros de inmovilización de *Alcalase*® inmovilizada sobre partículas de quitosano activadas con distintas concentraciones de glutaraldehído.

GLU (%)	Tiempo (h)	$\eta_p$ (%)	$\eta_a$ (%)	AE (UI/mg)	AE <sub>q</sub> (%)
0,05	2	18,27±4,37 <sup>a</sup>	9,57±3,53	170,46±62,83 <sup>a</sup>	52,40±19,31 <sup>a</sup>
	4	60,05±5,55 <sup>b</sup>	23,91±3,00	129,50±16,25 <sup>a</sup>	39,81±5,00 <sup>a</sup>
1,00	2	77,63±7,02 <sup>cd</sup>	65,74±1,22	275,45±5,10 <sup>b</sup>	84,67±1,57 <sup>b</sup>
	4	81,58±3,05 <sup>d</sup>	77,88±0,77	310,57±3,07 <sup>b</sup>	95,47±0,94 <sup>b</sup>
2,00	2	68,64±0,83 <sup>bc</sup>	64,01±5,50	303,38±26,08 <sup>b</sup>	93,26±8,02 <sup>b</sup>
	4	60,96±3,60 <sup>b</sup>	78,02±3,60	416,32±19,21 <sup>c</sup>	127,98±5,90 <sup>c</sup>
<b>Factor A: GLU</b>		*	*	*	*
<b>Factor B: Tiempo</b>		*	*	NS	NS
<b>Interacción AB</b>		*	NS	*	*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Letras diferentes, para cada parámetro, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Abreviaturas: GLU: Concentración de glutaraldehído. Tiempo: Tiempo de inmovilización.

En cuanto a los resultados de proteína residual obtenidos con *Flavourzyme*®, se observó un comportamiento similar al de *Alcalase*®. En términos generales, el tiempo de inmovilización ocasionó una reducción de la proteína presente en el sobrenadante, excepto en la concentración de glutaraldehído del 0,05%, donde se registró lo contrario. Por su parte, el efecto de la concentración del agente activante fue significativo al incrementar de 0,05 al 1%, pero no al pasar del 1 al 2%. Estos resultados, que a su vez se ven reflejados en el rendimiento de inmovilización calculado a partir de la proteína incorporada, indicarían que, al igual que *Alcalase*®, los mejores derivados para próximos ensayos son aquellos que se obtuvieron con las partículas de quitosano activadas con glutaraldehído al 1% (v/v). Esta condición tiene como ventaja la practicidad y la mejor sustentabilidad en su producción, ya que requiere menos concentración de agente activante, en comparación con el derivado que presentó resultados estadísticamente similares [2% (v/v)].

Teniendo en cuenta los resultados de actividad residual para esta enzima, se apreció que tanto el efecto del tiempo de inmovilización como el de la concentración de glutaraldehído resultó estadísticamente significativo. En otras palabras, el incremento de estas variables condujo a una reducción de la actividad presente en el sobrenadante de inmovilización. Este comportamiento se reflejó en los rendimientos de inmovilización en términos de actividad y sugieren que las mejores

condiciones son las de mayor tiempo y mayor concentración de agente activante. Sin embargo, al analizar los resultados de actividad teórica específica y actividad teórica equivalente, no se registraron diferencias significativas entre el 1% y el 2%. Las condiciones de inmovilización que presentaron los mayores valores de estos parámetros fueron aquellas que involucraron partículas activadas con 0,05% de glutaraldehído y 4 h de inmovilización.

**Tabla 16.** Parámetros de inmovilización de *Flavourzyme*® inmovilizada sobre partículas de quitosano activadas con distintas concentraciones de glutaraldehído.

GLU (%)	Tiempo (h)	$\eta_p$ (%)	$\eta_a$ (%)	AE (UI/mg)	AE <sub>q</sub> (%)
0,05	2	13,09±3,07 <sup>b</sup>	17,82±4,72	6,83±1,81 <sup>a</sup>	136,19±36,04 <sup>a</sup>
	4	4,06±0,59 <sup>a</sup>	46,44±1,20	57,40±1,48 <sup>c</sup>	1144,05±29,60 <sup>c</sup>
1,00	2	24,88±2,87 <sup>c</sup>	60,74±1,00	12,25±0,20 <sup>b</sup>	244,18±4,03 <sup>b</sup>
	4	33,72±1,55 <sup>d</sup>	83,80±2,72	12,47±0,40 <sup>b</sup>	248,53±8,06 <sup>b</sup>
2,00	2	28,32±3,51 <sup>cd</sup>	75,15±3,28	13,31±0,58 <sup>b</sup>	265,34±11,58 <sup>b</sup>
	4	39,73±0,08 <sup>c</sup>	94,01±1,50	11,87±0,19 <sup>b</sup>	236,65±3,78 <sup>b</sup>
<b>Factor A: GLU</b>		*	*	*	*
<b>Factor B: Tiempo</b>		*	*	*	*
<b>Interacción AB</b>		*	NS	*	*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Letras diferentes, para cada parámetro, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Abreviaturas: GLU: Concentración de glutaraldehído. Tiempo: Tiempo de inmovilización.

En resumen, entre las distintas concentraciones de glutaraldehído ensayadas, las condiciones adecuadas de inmovilización desde el punto de vista de proteína incorporada al soporte, se observaron con 1% (v/v) de glutaraldehído como agente activante del quitosano (tanto para *Alcalase*® como para *Flavourzyme*®). Sin embargo, desde el punto de vista de actividad incorporada, los mejores resultados se observaron con 2% (v/v) de glutaraldehído.

Los resultados teóricos obtenidos a partir de la actividad determinada en sobrenadantes y lavados coincidieron con la actividad práctica de los derivados (**Tabla 17**). Los derivados obtenidos a partir de partículas activadas con la mayor concentración de glutaraldehído [2% (v/v)] y el mayor tiempo de inmovilización (4 h) fueron los que registraron la mayor actividad práctica.

## Resultados y discusión

**Tabla 17.** Actividad práctica de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® inmovilizadas sobre partículas de quitosano activadas con distintas concentraciones de glutaraldehído.

Glutaraldehído (%)	Tiempo de inmovilización (h)	Actividad total (UI)	
		<i>Alcalase</i> ®	<i>Flavourzyme</i> ®
0,05	2	1,84±0,04 <sup>a</sup>	0,00±0,00
	4	2,66±0,65 <sup>b</sup>	0,00±0,00
1,00	2	1,81±0,15 <sup>a</sup>	0,00±0,00
	4	1,78±0,44 <sup>a</sup>	0,00±0,00
2,00	2	2,50±0,03 <sup>ab</sup>	0,07±0,02
	4	5,55±0,00 <sup>c</sup>	0,23±0,02
<b>Factor A: Glutaraldehído</b>		*	*
<b>Factor B: Tiempo de inmovilización</b>		*	*
<b>Interacción AB</b>		*	NS

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Letras diferentes, dentro de cada columna, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La actividad práctica de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® inmovilizadas se determinó con 10 ml de caseína 10 mg/ml y 0,5 g de enzima inmovilizada.

En la bibliografía se han registrado comportamientos similares al inmovilizar diversas enzimas (Hansupalak et al., 2010; Vaze et al., 2017; Bilal et al., 2019; Kamaldeep, 2023), destacándose la descripción del comportamiento típico de los procesos de inmovilización covalente, en los cuales una concentración baja de glutaraldehído lleva a una menor cantidad de uniones enzima-soporte (lo que podría indicar una unión covalente unipuntual) y, a su vez, a una fuga de moléculas enzimáticas. En cambio, a concentraciones más altas, aunque se evita esta fuga, puede ocurrir un exceso de uniones enzima-soporte (inmovilización multipuntual), lo que distorsiona la conformación enzimática debido a la rigidez adicional, o incluso causa desnaturalización de las enzimas (Hansupalak et al., 2010). Este exceso de entrecruzamiento también puede generar impedimentos estéricos o modificar la estructura del centro activo de la enzima (Bilal et al., 2019; Kamaldeep, 2023).

En cuanto a los controles (**Tablas 18 y 19**), en términos generales, es posible observar la ausencia de efecto significativo del tiempo de incubación sobre la proteína residual de *Alcalase*®, mientras que en el caso de *Flavourzyme*®, este comportamiento sucedió con la concentración de

agente activante. Con *Alcalase*®, los valores de proteína fueron inferiores en comparación con los obtenidos para la enzima en *buffer* (AR<100%); en contraste, con *Flavourzyme*® resultaron superiores (AR>100%). Este comportamiento podría atribuirse a la presencia de glutaraldehído. El entrecruzamiento inducido por este agente puede generar agregados proteicos del tipo CLEA, promoviendo reorganizaciones estructurales que alteren la accesibilidad de residuos básicos al colorante *Coomassie Blue G-250*, colorante empleado en el método de Bradford. Estas modificaciones suelen reducir la afinidad de la proteína por el colorante, lo que conduce comúnmente a una subestimación de la concentración proteica en el ensayo de Bradford. Aunque menos frecuente, en algunos casos podrían producirse exposiciones adicionales de residuos reactivos que resultarían en una sobrestimación. Por ello, estos resultados deben interpretarse con cautela.

**Tabla 18.** Proteína residual y actividad residual de los controles de inmovilización de *Alcalase*® empleando distintas concentraciones de agente activante.

Glutaraldehído (%)	Tiempo de inmovilización (h)	Proteína residual (%)	Actividad residual (%)
0,05	2	79,81±3,15	56,64±0,42
	4	63,67±1,31	42,09±9,85
1,00	2	50,65±0,64	7,78±0,51
	4	55,37±4,24	6,32±0,16
2,00	2	72,95±22,73	9,98±0,59
	4	83,90±1,85	8,40±0,78
<b>Factor A: Glutaraldehído</b>		*	*
<b>Factor B: Tiempo de inmovilización</b>		NS	*
<b>Interacción AB</b>		NS	NS

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Proteína o actividad residual calculada tomando como 100% la proteína o actividad de la solución de enzima en *buffer* carbonato 100 mM (pH 9) sin incubación, respectivamente.

En cuanto a la actividad, el tiempo ejerció su efecto sólo sobre los controles de *Alcalase*® reduciéndola en relación con la actividad inicial presentada por la enzima en *buffer*. Mientras que, la concentración de agente activante redujo la actividad de ambas enzimas al incrementar su

concentración de 0,05 a 1%, no encontrándose diferencias entre 1 y 2%. Como se ha visto en los controles de inmovilización empleando distintas técnicas, la presencia de glutaraldehído en estado libre podría estar afectando de manera negativa a las enzimas (Žuža et al., 2017). Como se mencionó anteriormente, los controles enzimáticos realizados en presencia de glutaraldehído (y en ausencia de soporte) implican, en términos técnicos, una inmovilización por reticulación, ya que el agente entrecruzante reacciona con las proteínas del sistema. Una reticulación enzimática descontrolada (enzima unida a través de varias moléculas de glutaraldehído) probablemente condujo a la formación de agregados enzimáticos que presentaron baja o nula actividad, evidenciada en la poca actividad registrada en el caso de *Alcalase*®, y en la actividad nula de la mayoría de los controles de *Flavourzyme*®.

**Tabla 19.** Proteína residual y actividad residual de los controles de inmovilización de *Flavourzyme*® empleando distintas concentraciones de agente activante.

Glutaraldehído (%)	Tiempo de inmovilización (h)	Proteína residual (%)	Actividad residual (%)
0,05	2	131,69±3,14 <sup>b</sup>	41,47±3,73
	4	129,93±1,38 <sup>b</sup>	38,56±3,04
1,00	2	136,06±5,67 <sup>b</sup>	0,00±0,00
	4	110,73±9,14 <sup>a</sup>	0,00±0,00
2,00	2	137,31±6,71 <sup>b</sup>	0,00±0,00
	4	110,72±3,95 <sup>a</sup>	0,00±0,00
<b>Factor A: Glutaraldehído</b>		NS	*
<b>Factor B: Tiempo de inmovilización</b>		*	NS
<b>Interacción AB</b>		*	NS

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Letras diferentes, dentro de cada columna, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Proteína o actividad residual calculada tomando como 100% la proteína o actividad de la solución de enzima en *buffer* fosfato 100 mM (pH 8) sin incubación, respectivamente.

Como se mencionó en los primeros estudios de inmovilización realizados (**sección 4.3.2.1**), el criterio de selección de las condiciones de activación de las partículas de quitosano se basó en los resultados de actividad registrados, dado que los derivados enzimáticos se utilizarán

para la hidrólisis de concentrado de proteínas de suero lácteo. Por ello, se optó por la inmovilización covalente con 2% (v/v) de glutaraldehído tanto para *Alcalase*® como para *Flavourzyme*®, ya que esta técnica presentó valores de actividad residual entre los más bajos, junto con un rendimiento de inmovilización adecuado en términos de actividad, actividad específica y actividad equivalente.

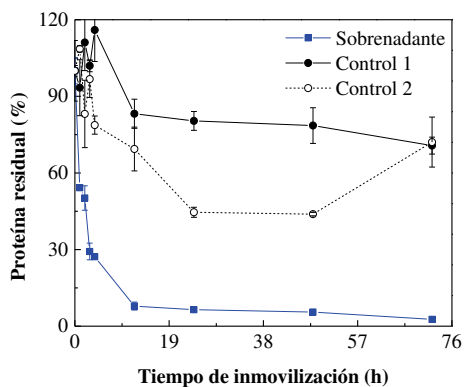
Finalmente, se evaluó la inmovilización de las enzimas en el tiempo, donde se estudió si mayores tiempos de incubación incrementan los rendimientos de inmovilización. Sin embargo, se prestó especial atención al comportamiento de *Flavourzyme*® ya que, aunque los resultados teóricos resultaron interesantes, los derivados evidenciaron una actividad práctica bastante baja y los controles registraron actividad nula en presencia de 1 y 2% de glutaraldehído.

#### 4.3.2.3. Análisis del efecto del tiempo de inmovilización

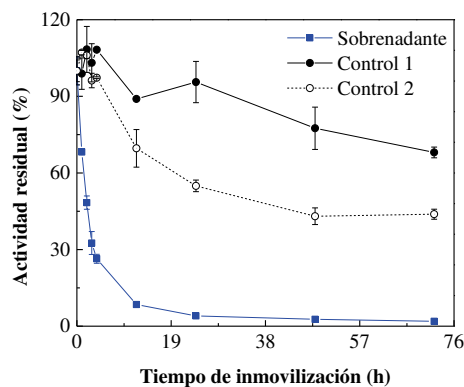
La inmovilización en el tiempo de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® sobre partículas de quitosano activadas con glutaraldehído al 2% (v/v) se visualiza en la **Figura 42 (Tabla A6.1, Anexo 6)** como proteína residual y actividad residual, junto con los controles de inmovilización (**Tablas A6.2 y A6.3, Anexo 6**). A partir de estos resultados se calcularon los parámetros de inmovilización, que se detallan en las **Tablas 20 y 21**.

Se observó una caída gradual del contenido proteico y de la actividad de las enzimas presentes en el sobrenadante. Esta caída gradual se detiene a las 12 h de inmovilización en el caso de *Alcalase*® (**Figuras 42.A1 y A2**), para luego mantenerse sin cambios hasta el tiempo final de incubación (72 h), mientras que con *Flavourzyme*® esto ocurre a las 48 h, en el caso de la proteína evaluada (**Figura 42.B1**), y a las 12 h en el caso de la actividad (**Figura 42.B2**).

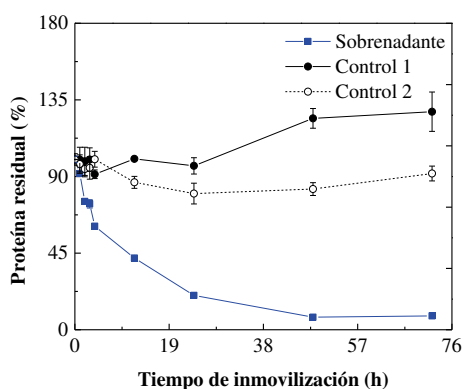
En la literatura se ha observado un comportamiento similar en estudios de inmovilización bajo diversas condiciones (Tardioli et al., 2003; Vaze et al., 2017; dos Santos Kimberle et al., 2020; Kamaldeep, 2023; Ramalho & de Castro, 2023), aunque a tiempos más cortos. Este fenómeno se ha justificado, por ejemplo, por la presencia de una cantidad significativa de residuos en *Alcalase*® que reaccionan rápidamente con el quitosano modificado con glutaraldehído (dos Santos Kimberle et al., 2020), así como por la alta reactividad del glutaraldehído (Ramalho & de Castro, 2023). Por otro lado, la menor actividad observada a tiempos de incubación prolongados se ha relacionado con la reducción de los sitios activos disponibles para la catálisis, debido a impedimentos estéricos, y con la disminución de la flexibilidad y el aumento de la rigidez de la enzima (Kamaldeep, 2023).



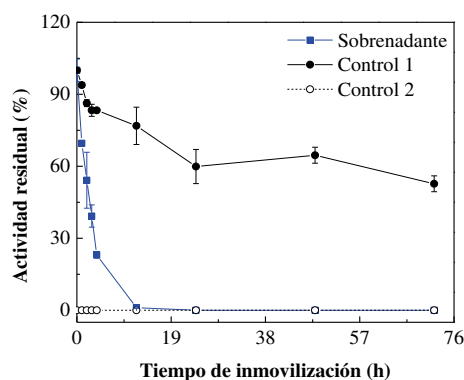
(A1)



(A2)



(B1)



(B2)

**Figura 42.** Evolución de la inmovilización de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) sobre partículas de quitosano activadas con glutaraldehído al 2%, expresada como proteína residual (1) y actividad residual (2). Control 1: Solución enzimática preparada en *buffer* carbonato de sodio 100 mM (pH 9) o en *buffer* fosfato de sodio 100 mM (pH 8), respectivamente. Control 2: Solución enzimática preparada en solución de glutaraldehído al 2%.

En cuanto a los controles, si bien se presentaron reducciones tanto de la proteína como de la actividad, los valores residuales fueron mayores en comparación con los sobrenadantes de inmovilización, y se mantuvieron, en la mayoría de los casos, constantes a lo largo del tiempo evaluado, alcanzando valores de proteína residual y actividad residual superiores al 70% y al 40%, respectivamente. En el caso del control en glutaraldehído, la presencia del agente activante en forma libre puede ser la responsable de la caída de proteína y de actividad registrada, que fue mayor en comparación con el control en *buffer*, principalmente luego de 4 h de incubación en el caso de *Alcalase*® y luego de 12 h, en el caso de la proteína residual en *Flavourzyme*®.

## Resultados y discusión

**Tabla 20.** Parámetros de inmovilización de *Alcalase*® inmovilizada en el tiempo sobre partículas de quitosano activadas con glutaraldehído al 2%.

Tiempo de inmovilización (h)	$\eta_p$ (%)	$\eta_a$ (%)	AE (UI/mg)*	AE <sub>q</sub> (%)*
0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	-	-
1	45,79±5,89 <sup>b</sup>	31,78±6,60 <sup>b</sup>	198,01±41,13	69,40±14,42
2	49,82±0,33 <sup>b</sup>	51,62±8,14 <sup>c</sup>	295,64±46,64	103,62±16,35
3	70,75±1,84 <sup>c</sup>	67,43±10,01 <sup>d</sup>	271,94±40,38	95,31±14,15
4	72,81±4,70 <sup>c</sup>	73,60±3,77 <sup>d</sup>	288,43±14,76	101,09±5,17
12	92,13±3,55 <sup>d</sup>	91,52±6,02 <sup>e</sup>	283,44±18,65	99,34±6,54
24	93,56±4,59 <sup>d</sup>	95,96±5,51 <sup>e</sup>	292,64±16,81	102,57±5,89
48	94,48±4,30 <sup>d</sup>	97,31±5,45 <sup>e</sup>	293,87±16,47	102,99±5,77
72**	97,34±4,71 <sup>d</sup>	97,88±5,52 <sup>e</sup>	286,88±16,17	100,55±5,67

Letras diferentes, dentro de cada columna, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\* La ausencia de letras, dentro de cada columna, indica que no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

\*\* Los parámetros de inmovilización a 72 h se calcularon teniendo en cuenta la proteína o la actividad presente en el sobrenadante, lavado y *buffer* correspondiente.

En cuanto a la actividad del control de *Flavourzyme*® en glutaraldehído, ésta fue nula en todos los tiempos evaluados, como también se observó en los estudios de inmovilización con distintas concentraciones de agente activante. El glutaraldehído podría estar afectando la estructura de las enzimas, más aún de *Flavourzyme*®, al promover la precipitación o la formación de agregados con poca o nula actividad. Es importante mencionar que este fenómeno se presenta ya que el agente activante se encuentra reaccionando en ausencia de la matriz soporte. En el proceso de inmovilización empleado, el glutaraldehído interactúa preferentemente de forma covalente con uno de sus grupos aldehído con el grupo amino libre del quitosano, dejando disponible el otro grupo aldehído, el cual puede reaccionar luego con residuos aminoácidos básicos de la enzima, como lisina e histidina. Este mecanismo reduce la formación de agregados enzimáticos con baja actividad, favoreciendo una inmovilización más eficiente.

Dado que los derivados enzimáticos se utilizarán para la hidrólisis de concentrado de proteínas de suero lácteo, la actividad enzimática retenida tras la inmovilización fue el criterio principal para su selección. Por ello, se optó por 12 h de incubación para la inmovilización covalente de *Alcalase*®, ya que a partir de dicho tiempo no se observaron cambios significativos

en la actividad presente en el sobrenadante. En cuanto a *Flavourzyme*®, si bien se seleccionó 24 h como tiempo de inmovilización (80% de proteína residual y actividad residual nula), el biocatalizador obtenido no evidenció actividad catalítica frente a caseína. Por lo tanto, con esta enzima se llevaron a cabo estudios adicionales con el objetivo de determinar rápidamente las condiciones de inmovilización que permitan obtener un derivado con actividad proteolítica apreciable. Estos estudios involucraron la determinación de la actividad práctica de biocatalizadores sintetizados con distintas concentraciones de agente activante [0,02 y 1% (v/v)] y de enzima [3,2 y 6,4% (m/v)] y distintos tiempos de inmovilización (2, 6 y 24 h).

**Tabla 21.** Parámetros de inmovilización de *Flavourzyme*® inmovilizada en el tiempo sobre partículas de quitosano activadas con glutaraldehído al 2%.

Tiempo de inmovilización (h)	$\eta_p$ (%)	$\eta_a$ (%)	AE (UI/mg)*	AE <sub>q</sub> (%)*
0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	-	-
1	8,22±3,10 <sup>b</sup>	30,37±3,81 <sup>b</sup>	22,28±2,80 <sup>c</sup>	369,31±46,36 <sup>c</sup>
2	24,62±3,05 <sup>c</sup>	45,80±6,98 <sup>c</sup>	11,22±1,71 <sup>c</sup>	186,06±28,36 <sup>c</sup>
3	26,08±0,57 <sup>c</sup>	60,73±0,03 <sup>d</sup>	14,05±0,01 <sup>d</sup>	232,86±0,10 <sup>d</sup>
4	39,17±1,88 <sup>d</sup>	76,97±3,35 <sup>e</sup>	11,85±0,52 <sup>cd</sup>	196,48±8,54 <sup>cd</sup>
12	57,89±1,51 <sup>e</sup>	98,91±4,95 <sup>f</sup>	10,31±0,52 <sup>bc</sup>	170,85±8,56 <sup>bc</sup>
24	79,81±1,71 <sup>f</sup>	100,00±4,67 <sup>f</sup>	7,56±0,35 <sup>ab</sup>	125,29±5,85 <sup>ab</sup>
48	92,64±1,47 <sup>g</sup>	100,00±4,67 <sup>f</sup>	6,51±0,30 <sup>a</sup>	107,95±5,04 <sup>a</sup>
72**	90,04±3,57 <sup>g</sup>	100,00±4,67 <sup>f</sup>	6,70±0,31 <sup>a</sup>	111,06±5,19 <sup>a</sup>

Letras diferentes, dentro de cada columna, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\*\* Los parámetros de inmovilización a 72 h se calcularon teniendo en cuenta la proteína o la actividad presente en sobrenadante, lavado y *buffer* correspondiente.

En la **Tabla 22** se presenta la actividad práctica evidenciada por los derivados obtenidos, donde es posible observar que las variables estudiadas ejercieron su efecto sobre la actividad práctica de *Flavourzyme*® inmovilizada. Por un lado, no se observó una tendencia clara del efecto de la concentración de enzima. Esto puede deberse al hecho de que la estrategia planteada no implica una inmovilización dirigida, por ende, es posible que las uniones enzima-soporte se presenten en algunos casos mediante residuos cercanos o implicados en el sitio activo de la enzima, ocasionando la reducción de su actividad (Czechowska et al., 2018; Robescu & Bavaro,

2025). Mientras que, en otros casos dichas uniones se presentaron a través de sitios no catalíticos de la enzima, lo que se reflejaría en una menor pérdida de actividad.

**Tabla 22.** Actividad práctica de *Flavourzyme*® inmovilizada bajo distintas condiciones.

<b>Enzima</b> [% (m/v)]	<b>Glutaraldehído</b> [% (v/v)]	<b>Tiempo de inmovilización (h)</b>	<b>Actividad práctica (UI)</b>
3,2	0,02	2	15,56±1,44 <sup>d</sup>
		6	24,03±0,29 <sup>h</sup>
		24	13,78±0,10 <sup>c</sup>
	1,00	2	8,49±0,10 <sup>a</sup>
		6	22,69±0,92 <sup>g</sup>
		24	11,10±0,30 <sup>b</sup>
6,4	0,02	2	23,46±0,81 <sup>gh</sup>
		6	13,89±0,13 <sup>c</sup>
		24	20,04±0,19 <sup>ef</sup>
	1,00	2	19,04±0,88 <sup>e</sup>
		6	9,44±0,71 <sup>a</sup>
		24	20,86±1,35 <sup>f</sup>
<b>Factor A: Enzima</b>			*
<b>Factor B: Glutaraldehído</b>			*
<b>Factor C: Tiempo de inmovilización</b>			*
<b>Interacción AB</b>			NS
<b>Interacción AC</b>			*
<b>Interacción BC</b>			*
<b>Interacción ABC</b>			*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La actividad práctica se determinó con 8 ml de caseína 10 mg/ml y 0,5 g de enzima inmovilizada durante 15 min de reacción.

Por otro lado, la concentración de agente activante, en la mayoría de los casos, ocasionó una reducción de la actividad de la enzima inmovilizada tras su incremento. Esto puede deberse, como se mencionó en casos anteriores, a una menor flexibilidad enzimática como consecuencia de un incremento de las uniones soporte-enzima a medida que el soporte presentaba una activación superior. Por último, con respecto al tiempo de incubación se observó un aumento seguido de una reducción de la actividad práctica tras el incremento del tiempo de inmovilización con 3,2% (m/v) de enzima. Mientras que, sucedió lo contrario con la concentración más alta de enzima [6,4% (m/v)]. El tiempo de inmovilización puede afectar a la enzima de dos maneras diferentes. Un mayor tiempo de incubación dará lugar a un mayor número de uniones covalentes entre enzima y soporte. Esto puede afectar la actividad de manera positiva al ser mayor la cantidad de catalizador inmovilizado sobre el soporte o puede afectar la actividad negativamente al volverse más rígida la estructura del catalizador y menos accesibles los sitios activos para el sustrato (Najavand et al., 2020; Kamaldeep, 2023).

A partir de los resultados obtenidos, es posible observar que ciertas condiciones permitieron obtener derivados con una actividad práctica superior a 20 UI. Estas condiciones fueron las siguientes: **a)**- 3,2% (m/v); 0,02% (v/v) y 6 h; **b)**- 3,2% (m/v), 1% (v/v) y 6 h; **c)**- 6,4% (m/v); 0,02% (v/v) y 2 h; **d)**- 6,4% (m/v), 0,02% (v/v) y 24 h; y **e)**- 6,4% (m/v), 1% (v/v) y 24 h. Considerando la necesidad de minimizar tanto el consumo de enzima como el consumo de agente activante, las condiciones de inmovilización seleccionadas para *Flavourzyme*® fueron las correspondientes a la opción A, es decir, aquellas que involucraron 3,2% (m/v) de enzima, 0,02% (v/v) de glutaraldehído y 6 h de inmovilización.

En relación con lo observado en *Flavourzyme*®, es importante recordar que esta preparación comercial corresponde a una mezcla enzimática compleja, compuesta por diversas unidades proteicas con actividades tanto exo- como endopeptidasas (Hansupalak et al., 2010; del Mar Yust et al., 2013; Merz et al., 2015b). Si bien esta heterogeneidad le confiere una capacidad proteolítica amplia y versátil, también representa un desafío considerable para su inmovilización covalente multipuntual, ya que cada subunidad puede reaccionar de manera distinta frente a los agentes activantes y a las condiciones del proceso, lo que puede afectar negativamente la actividad global y la estabilidad del biocatalizador resultante (Mateo et al., 2007). Debido a esta complejidad estructural y funcional, los estudios sobre inmovilización covalente multipuntual de *Flavourzyme*® son escasos. En este contexto, el desarrollo y optimización de condiciones específicas para su inmovilización, como se propone en este trabajo, representa un avance significativo, no sólo para obtener un biocatalizador activo a partir de *Flavourzyme*®, sino también para abrir nuevas posibilidades en su aplicación en procesos biotecnológicos de hidrólisis de proteínas (Yust et al., 2007; Hansupalak et al., 2010; Zhao et al., 2025).

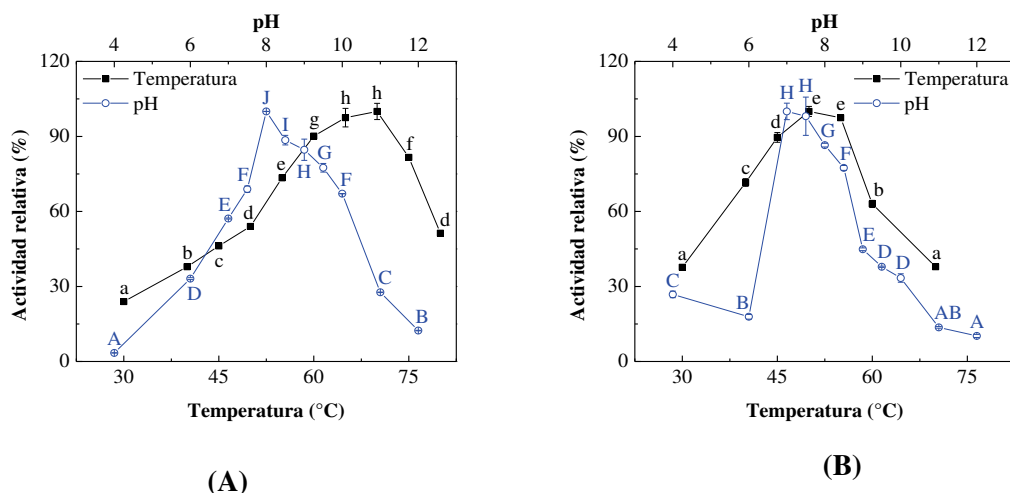
#### **4.4. Caracterización bioquímica, funcional y cinética de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado inmovilizado**

La síntesis de biocatalizadores insolubles requiere del conocimiento del comportamiento del catalizador, no sólo en su estado libre sino también en su estado inmovilizado. Por ello, es fundamental realizar una caracterización de la actividad de las enzimas inmovilizadas, con el fin de identificar posibles alteraciones derivadas del proceso de inmovilización y atribuirles a los fenómenos fisicoquímicos involucrados. Esto permite, además, evaluar el potencial de los biocatalizadores insolubilizados en aplicaciones industriales, como la hidrólisis de proteínas en condiciones controladas, su reutilización y su implementación en sistemas productivos.

La caracterización de las enzimas inmovilizadas comprendió una serie de ensayos que respondieron a tres enfoques distintos: bioquímico, funcional y cinético. En la caracterización bioquímica, se evaluó la actividad enzimática de los derivados producidos a diversas temperaturas y valores de pH. La caracterización funcional se centró en pruebas de estabilidad térmica, frente al pH, operacional y durante el almacenamiento. Finalmente, la caracterización cinética se llevó a cabo a través del estudio del efecto de la variación de la concentración de sustrato y derivado sobre la actividad enzimática.

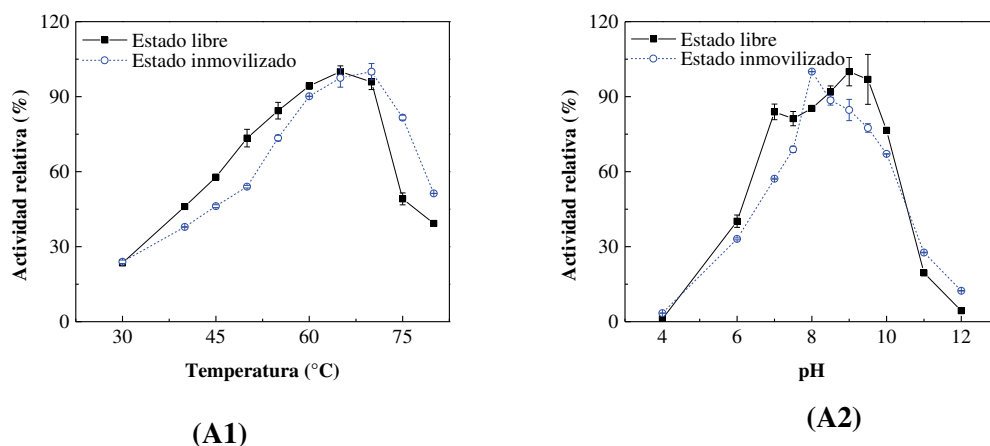
##### **4.4.1. Estudios de temperatura y pH óptimos**

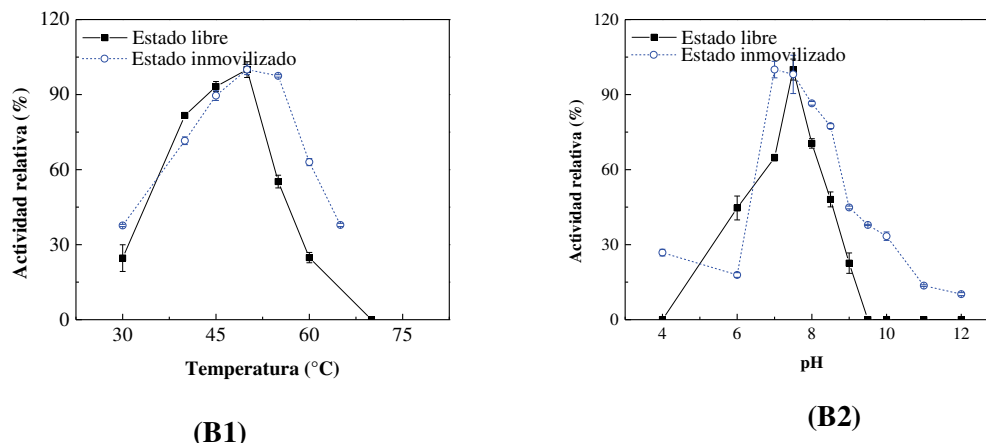
La actividad relativa de los derivados de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® a distintas temperaturas y valores de pH se muestra en la **Figura 43**. Se observa un desplazamiento en la temperatura óptima de actividad tras la inmovilización en ambas enzimas (**Figura 44 y Tabla A7.1, Anexo 7**). Para *Alcalase*®, la enzima libre alcanzó su máxima actividad (100%) a 65°C, sin diferencias estadísticamente significativas respecto del 95,88% a 70°C, mientras que el derivado inmovilizado mostró su máxima actividad (100%) a 70°C, sin diferencias significativas con el valor observado a 65°C (97,50%). En el caso de *Flavourzyme*®, tanto la forma libre como la inmovilizada alcanzaron su máxima actividad (100%) a 50°C; sin embargo, en la enzima inmovilizada no se observaron diferencias significativas con respecto al valor registrado a 55°C (97,47%), lo que sugiere una leve ampliación del rango de temperatura óptima. A partir de estas temperaturas, la actividad disminuye al continuar el aumento de la variable. Este comportamiento típico de reacciones enzimáticas también se observó con las enzimas en estado libre: un incremento de la velocidad de reacción al aumentar la temperatura hasta cierto punto ya que luego, ocasiona la desnaturalización de la enzima, reflejada en una reducción de la velocidad de reacción (Kumar et al., 2009).



**Figura 43.** Actividad relativa de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado inmovilizado, evaluada a distintas temperaturas o valores de pH. Se tomó como 100% de actividad a la condición que arrojó el máximo para cada ensayo en cada condición. Resultados del ANOVA: letras minúsculas o mayúsculas diferentes, para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los resultados a distintas temperaturas o valores de pH, respectivamente.

Sin embargo, es posible observar algunos cambios ocasionados por la inmovilización. La actividad relativa a temperaturas superiores a 65°C en *Alcalase*® y a 50°C en *Flavourzyme*® es más alta en las enzimas inmovilizadas, en comparación con sus versiones en estado libre, lo que podría indicar una estabilización enzimática como resultado del proceso de inmovilización (Lopes et al., 2020). Mientras que, a temperaturas más bajas, ocurre lo contrario, es decir, la actividad cae de forma más rápida. Esto podría deberse al hecho de que parte de los sitios activos se encuentran obstaculizados o unidos al soporte, lo que dificulta la accesibilidad del sustrato a bajas temperaturas (Liao & Huang, 2019). Asimismo, al aumentar la temperatura óptima aparente del derivado, se amplía el rango de temperaturas bajas en la que la actividad cae a cero, debido a que la accesibilidad del sustrato a esas condiciones resulta termodinámicamente menos favorable.





**Figura 44.** Actividad relativa de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado libre e inmovilizado, evaluada a distintas temperaturas (1) y a distintos valores de pH (2).

En función de los resultados obtenidos, para los ensayos a distintos valores de pH, se utilizó la temperatura a la cual las enzimas presentaron los valores más altos de actividad (100%), es decir, 70°C para *Alcalase*® y 50°C para *Flavourzyme*®.

Al igual que con la temperatura, se observó un desplazamiento en el pH óptimo de actividad tras la inmovilización de las enzimas (**Figura 44 y Tabla A7.2, Anexo 7**). En el caso de *Alcalase*®, la enzima libre presentó su máxima actividad (100%) a pH 9, sin diferencias estadísticamente significativas con los valores obtenidos a pH 9,5 (96,90%) y a pH 8,5 (91,96%), mientras que el derivado inmovilizado alcanzó el 100% de actividad a pH 8. Por otro lado, *Flavourzyme*® libre presentó su máxima actividad a pH 7,5, en tanto que la forma inmovilizada alcanzó el 100% a pH 7, sin diferencias significativas con el valor observado a pH 7,5 (98,08%). A partir de estos valores de pH, la actividad disminuye al continuar el aumento de la variable. Este comportamiento depende no sólo de los grupos ionizables presentes en las enzimas en las condiciones de pH evaluadas, los cuales pueden estar involucrados en los sitios activos, sino también de los cambios estructurales inducidos por la inmovilización y de las características del soporte utilizado (en este caso, quitosano) el cual podría ejercer un efecto significativo sobre el pH aparente de la enzima inmovilizada.

*Alcalase*®, como su nombre lo indica, es una proteasa alcalina (Tacias-Pascacio et al., 2020) que destaca por su actividad y estabilidad a valores de pH alcalinos. Si bien hubo un cambio de una unidad en el pH óptimo tras ser inmovilizada (de pH 9 a 8), aún continúan siendo condiciones de hidrólisis alcalinas. Además, en términos generales, la enzima en estado libre presentó mayores valores de actividad relativa, lo que indicaría que la inmovilización afectó el perfil de actividad de *Alcalase*® frente al pH. Por su parte, como se ha visto previamente,

*Flavourzyme*® es una mezcla de proteasas que se caracteriza por hidrolizar sustratos en condiciones preferentemente neutras o ligeramente ácidas (Yust et al., 2007). En este caso, la inmovilización no ocasionó cambios en las condiciones hidrolíticas óptimas; sin embargo, mejoró la actividad de la enzima, ya que en su estado libre la actividad a pH 4; 9,5; 10, 11 y 12 fue nula. Mientras que, la enzima inmovilizada registró actividades relativas que oscilaron entre el 10% y el 38% en esos mismos valores de pH. Además, por encima del pH óptimo, la actividad relativa de *Flavourzyme*® inmovilizada fue superior en comparación con la actividad de la enzima en estado libre, comportamiento distinto al observado con *Alcalase*®.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los pH 8 y 7,5 para los siguientes ensayos de caracterización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® inmovilizadas, respectivamente.

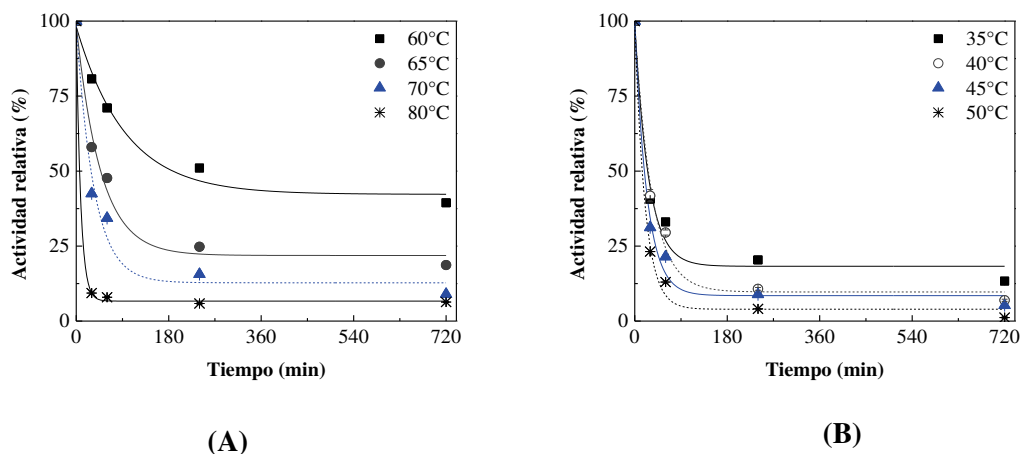
En la bibliografía se han reportado resultados que se relacionan con los obtenidos en el presente estudio (Ferreira et al., 2003; Vafabakhsh et al., 2013; Wang et al., 2014; Wu et al., 2014b; Dai et al., 2017; Liu et al., 2017; Yang et al., 2017; Aslan et al., 2018; Liao & Huang, 2019; Zhao et al., 2025). De su análisis se destacan, por un lado, la mayor sensibilidad al pH observada en algunas enzimas inmovilizadas, la cual ha sido atribuida tanto a la restricción de cambios conformacionales impuesta por la unión al soporte (Wang et al., 2014), como a interacciones no covalentes entre la enzima y el material de soporte (Liao & Huang, 2019). Por otro lado, la idea de que una enzima sea funcional en un amplio rango de pH representa una característica deseable para múltiples aplicaciones prácticas (Wang et al., 2014). Asimismo, diversos autores han relacionado la mejora en la estabilidad durante la hidrólisis a distintas temperaturas con la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte, los cuales restringen la flexibilidad conformacional y, en consecuencia, aumentan la estabilidad térmica (Zhao et al., 2025).

#### **4.4.2. Evaluación de la estabilidad frente a la temperatura y frente al pH**

La viabilidad de los procesos catalizados por enzimas depende en gran medida del mantenimiento de su actividad catalítica a lo largo del tiempo. En este contexto, la inactivación térmica del biocatalizador es una de las principales causas de pérdida de actividad, por lo que evaluar su estabilidad térmica resulta fundamental para caracterizar eficazmente cualquier sistema inmovilizado (Catana et al., 2007).

Es particularmente deseable obtener derivados activos estables a altas temperaturas, ya que permitiría alcanzar mayores conversiones y, en consecuencia, una mayor productividad. Por ello, como parte de la caracterización, se analizó la actividad residual de las enzimas inmovilizadas, pre-incubadas a distintas temperaturas y tiempos. Los resultados se muestran en

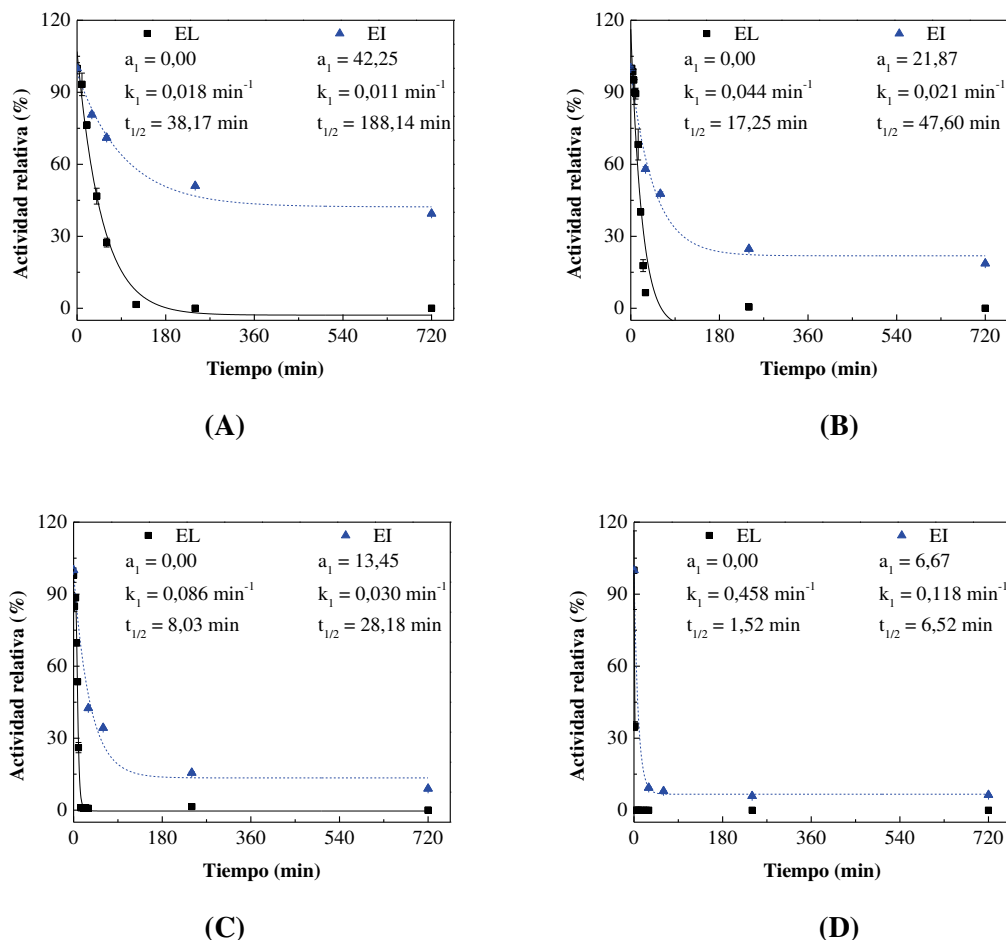
la **Figura 45** (Tablas A7.3 y A7.4, Anexo 7) como actividad relativa en relación con la inicial registrada a tiempo cero.



**Figura 45.** Estabilidad térmica de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado inmovilizado.

Es posible observar una reducción de la actividad, tanto con el incremento de la temperatura como con el tiempo de pre-incubación. Después de 720 min de pre-incubación, *Alcalase*® conservó entre un 6% y un 40% de su actividad inicial a las temperaturas evaluadas. Estos valores fueron superiores a los registrados por la enzima en estado libre, la cual, luego de los 240 min retuvo menos del 2% de su actividad inicial e incluso mostró, para la mayoría de los casos, valores nulos de actividad a las mismas temperaturas (**Figura 46**). Mientras que *Alcalase*® en su estado libre mantuvo un 50% de la actividad inicial luego de aproximadamente 40, 20 y 8 min de pre-incubación a 60, 65 y 70°C, respectivamente, *Alcalase*® inmovilizada mantuvo dicho porcentaje después de tiempos de pre-incubación superiores: 240, 60 y 30 min, respectivamente. A 80°C, la actividad residual del *Alcalase*® inmovilizada se mantuvo cerca del 6% hasta el tiempo final de pre-incubación (720 min), mientras que, la actividad de la enzima en estado libre fue nula luego de 4 min de incubación.

Varios autores también han reportado mejoras en la estabilidad térmica de *Alcalase*® tras su inmovilización bajo diferentes condiciones. Dichas mejoras se han atribuido a la restricción del contacto intermolecular, que previene la autoproteólisis, y a la protección estructural conferida por las uniones multipunto al soporte (Ferreira et al., 2003); a un aumento de la rigidez estructural de la enzima (Wang et al., 2014; Yang et al., 2017); y a la protección frente al desdoblamiento térmico proporcionada por la inmovilización (Wang et al., 2014). No obstante, también se han informado casos en los que la inmovilización no afectó significativamente la estabilidad térmica de la enzima (Aslan et al., 2018), lo cual resulta poco común, ya que habitualmente se observa algún grado de modificación, ya sea positiva o negativa.

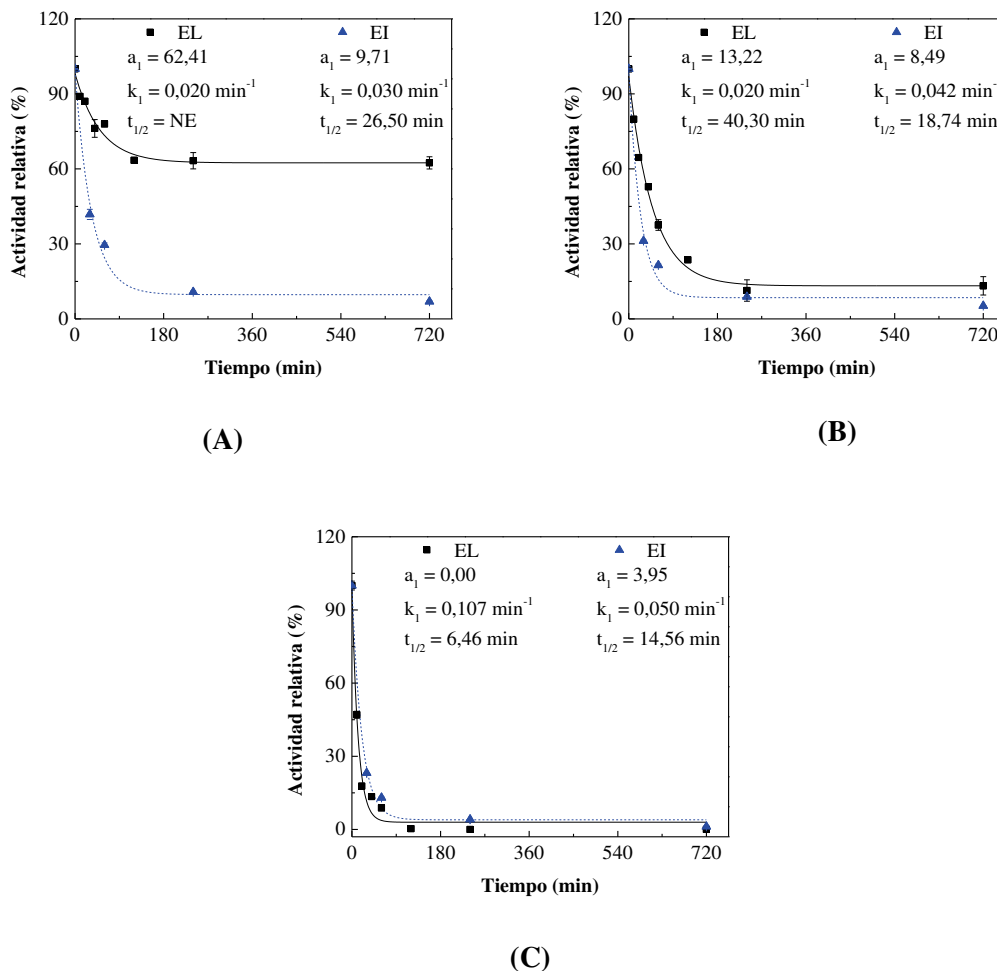


**Figura 46.** Estabilidad térmica de *Alcalase*® en estado libre (EL; pH 9) e inmovilizado (EI; pH 8). (A) 60°C. (B) 65°C. (C) 70°C. (D) 80°C.  $a_1 = \alpha_1$ . Los valores de actividad relativa en estado libre a 720 min se estimaron a partir de los datos proporcionados por las regresiones.

En el caso de *Flavourzyme*®, el derivado conservó entre un 1% y un 13% de la actividad inicial luego de 720 min de pre-incubación a las temperaturas evaluadas (**Figura 45.B y Tabla A7.4, Anexo 7**). A diferencia de lo observado con *Alcalase*®, estos valores fueron menores a los presentados por la enzima libre, la cual después de 240 min de pre-incubación retuvo un 63 y 11% de actividad inicial a 40 y 45°C, respectivamente (**Figura 47**). A 50°C, tanto la enzima libre como inmovilizada registraron valores menores al 1% luego de tiempos prolongados de incubación. Mientras que, *Flavourzyme*® en su estado libre mantuvo un 50% de la actividad inicial luego de aproximadamente más de 240 min, 40 y 10 min de pre-incubación a 40, 45 y 50°C, respectivamente, *Flavourzyme*® inmovilizada mantuvo dicho porcentaje antes de los 30 min de pre-incubación.

En la bibliografía se han reportado tanto mejoras en la estabilidad térmica de *Flavourzyme*® tras su inmovilización (Zhao et al., 2025), como casos en los que dicha estabilidad

resultó menor en comparación con la enzima libre (Vafabakhsh et al., 2013). Al igual que lo observado para *Alcalase*®, las mejoras en estabilidad han sido atribuidas a las interacciones entre la enzima y el soporte, que restringen los cambios conformacionales a altas temperaturas.



**Figura 47.** Estabilidad térmica de *Flavourzyme*® en estado libre (EL; pH 7,5) e inmovilizado (EI; pH 7,5). (A) 40°C. (B) 45°C. (C) 50°C.  $a_1 = \alpha_1$ . NE = no estimado. Los valores de actividad relativa en estado libre a 720 min se estimaron a partir de los datos proporcionados por las regresiones.

En el presente trabajo, la menor estabilidad térmica observada para la enzima *Flavourzyme*® inmovilizada, en comparación con la libre, puede atribuirse a varios factores. Uno de ellos es que *Flavourzyme*® es una mezcla multienzimática, por lo que no todas las unidades catalíticas de la enzima pueden quedar efectivamente inmovilizadas en el soporte, lo que podría explicar la reducción de la actividad global observada. Este aspecto también podría ayudar a entender las diferencias en los resultados reportados por otros estudios donde se utilizaron distintos procesos de inmovilización como la encapsulación liposomal (Vafabakhsh et al., 2013) o el uso de soportes de sílice (Zhao et al., 2025). Además, la formulación comercial de *Flavourzyme*® contiene estabilizantes que pueden ser efectivos en la enzima libre pero no están

presentes en la versión inmovilizada, lo cual contribuye a una diferencia significativa en comparación con la forma libre que mantiene todos sus aditivos protectores. Por lo tanto, un análisis comparativo entre la forma inmovilizada y una enzima dializada, sin estabilizantes, podría proporcionar información crucial para comprender cómo la técnica de inmovilización influye en la estabilidad térmica de *Flavourzyme*®.

Las conclusiones planteadas a partir de las actividades relativas obtenidas se reflejan en los parámetros de inactivación térmica presentados en la **Tabla 23**. Es posible observar que estos parámetros se vieron afectados por la temperatura. Tanto el parámetro  $\alpha_1$  como el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) disminuyeron su valor con el incremento de la temperatura, mientras que, ocurrió lo contrario con el coeficiente de inactivación ( $k_1$ ), presentándose algunas excepciones en el caso de *Flavourzyme*®. Estos resultados indicarían que, al igual que como sucedió con las enzimas en estado libre, las enzimas inmovilizadas presentaron mayor estabilidad a la menor temperatura evaluada: 60°C en el caso de *Alcalase*® y 35-40°C en el caso de *Flavourzyme*®. Estas temperaturas difieren de la temperatura óptima de hidrólisis de caseína, la cual fue 70 y 50°C, respectivamente. En comparación con la enzima libre (**Figura 46**), la inmovilización mejoró la estabilidad térmica de *Alcalase*® ya que se redujo el  $k_1$  y se incrementó el  $t_{1/2}$ . Sin embargo, con *Flavourzyme*® esta mejora sólo se presentó a 50°C.

**Tabla 23.** Parámetros de inactivación térmica de *Alcalase*® (pH 8) y *Flavourzyme*® (pH 7,5) en estado inmovilizado, según el modelo de Sadana-Henley.

Enzima	Temperatura (°C)	$\alpha_1$	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
<i>Alcalase</i> ®	60	42,25±0,01 <sup>d</sup>	0,011±0,000 <sup>a</sup>	188,14±6,90 <sup>d</sup>
	65	21,87±0,08 <sup>c</sup>	0,021±0,000 <sup>b</sup>	47,60±1,59 <sup>c</sup>
	70	13,45±0,36 <sup>b</sup>	0,030±0,001 <sup>c</sup>	28,18±0,03 <sup>b</sup>
	80	6,67±0,23 <sup>a</sup>	0,118±0,001 <sup>d</sup>	6,52±0,18 <sup>a</sup>
<i>Flavourzyme</i> ®	35	18,26±0,20 <sup>d</sup>	0,037±0,000 <sup>b</sup>	25,09±0,21 <sup>c</sup>
	40	9,71±0,23 <sup>c</sup>	0,030±0,001 <sup>a</sup>	26,50±1,40 <sup>c</sup>
	45	8,49±0,18 <sup>b</sup>	0,042±0,001 <sup>c</sup>	18,74±0,31 <sup>b</sup>
	50	3,95±0,23 <sup>a</sup>	0,050±0,000 <sup>d</sup>	14,56±0,02 <sup>a</sup>

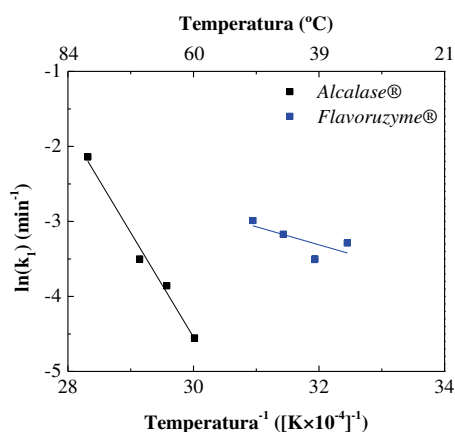
Letras diferentes, dentro de una misma columna y para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la literatura también se han reportado reducciones en las constantes de inactivación, así como incrementos en el tiempo de vida media y en el valor de  $\alpha_1$  tras la inmovilización

enzimática (Ferreira et al., 2003; Tardioli et al., 2003; Yust et al., 2007; Liao & Huang, 2019). Estas mejoras se han asociado, en parte, a la formación de enlaces covalentes entre el soporte y la enzima (Yust et al., 2007; Liao & Huang, 2019). Además, otros factores como la restricción de interacciones intermoleculares, que ayuda a prevenir procesos de autólisis, y la protección frente a cambios conformacionales mediante la unión multipunto al soporte también han sido señalados como responsables del aumento en la estabilidad térmica (Yust et al., 2007).

A pesar de los avances logrados y, teniendo en cuenta que uno de los principales requisitos para la aplicación de enzimas como biocatalizadores industriales es su estabilidad bajo condiciones operativas (Yust et al., 2007), aún se considera necesario realizar ajustes en el proceso de inmovilización de *Flavourzyme*® para mejorar la estabilidad térmica del derivado final. En este sentido, sería importante evaluar variables como la presencia de estabilizantes, considerar el uso del preparado dializado y, eventualmente, explorar la posibilidad de inmovilizar las fracciones enzimáticas por separado.

Como se indicó en la metodología, también se realizó la gráfica de Arrhenius a partir de los resultados de estabilidad térmica (**Figura 48**), y se calcularon la energía de activación, la entalpía, la entropía y la energía libre (**Tabla 24**). Como se aprecia en la gráfica, *Alcalase*® presentó una relación lineal entre el logaritmo natural de los coeficientes de inactivación y la inversa de las temperaturas absolutas, lo que refleja una reacción de desnaturalización simple de un solo paso. Sin embargo, *Flavourzyme*® no mostró este comportamiento, por lo que al análisis de los datos de esta enzima se sumó la regresión en tramos (**Figura 48**) y se calcularon las energías de activación, las entalpías, las entropías y las energías libres de Gibbs para cada uno de ellos (**Tabla 25**). Estos comportamientos son similares a los observados con las enzimas en su estado libre.



**Figura 48.** Gráfica de Arrhenius de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado inmovilizado.

A partir de la regresión lineal de los datos de *Alcalase*®, se registraron valores positivos tanto de entalpía como de entropía y energía libre. Mientras que, en el caso de *Flavourzyme*®, la

entropía reflejó valores negativos. Como se mencionó en la sección de caracterización de las enzimas en estado libre, la entalpía se define como el calor necesario para desnaturalizar una enzima. Por lo tanto, valores altos y positivos se asocian a una enzima estable (Bhunja et al., 2013). En este caso, tanto *Alcalase*® como *Flavourzyme*® registraron valores altos y positivos de entalpía, lo que podría indicar una gran estabilidad de ambas a las temperaturas evaluadas, con valores promedio de 113 y 17 kJ/mol, respectivamente. Sin embargo, es importante tener presente que la estabilidad térmica no depende únicamente de la entalpía, sino de un equilibrio entre entalpía y entropía. A su vez, es posible observar que estos resultados se relacionan con las conclusiones anteriores. En otras palabras, la inmovilización no mejoró sustancialmente la estabilidad térmica de *Flavourzyme*®, reflejado en la menor entalpía registrada en comparación con la enzima en su estado libre (100 kJ/mol). En el caso de *Alcalase*®, los resultados entrópicos tanto de la enzima inmovilizada como de la enzima libre fueron superiores a 100 kJ/mol (libre: 146 kJ/mol, inmovilizada: 113 kJ/mol).

**Tabla 24.** Parámetros de inactivación térmica de *Alcalase*® (pH 8) y *Flavourzyme*® (pH 7,5) en estado inmovilizado, según el modelo de Arrhenius.

Enzima	Temperatura (°C)	$\Delta H$ (kJ/mol)*	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol·K)*
<i>Alcalase</i> ®	60	113,08±0,81	73,68±0,08 <sup>c</sup>	118,25±2,66
	65	113,03±0,81	72,78±0,06 <sup>b</sup>	119,04±2,56
	70	112,99±0,81	72,80±0,05 <sup>b</sup>	117,12±2,21
	80	112,91±0,81	70,84±0,04 <sup>a</sup>	119,13±2,38
<i>Flavourzyme</i> ®	35	17,48±0,50	65,10±0,01 <sup>a</sup>	-154,54±1,64
	40	17,44±0,50	66,68±0,12 <sup>b</sup>	-157,24±1,98
	45	17,40±0,50	66,83±0,03 <sup>b</sup>	-155,37±1,67
	50	17,35±0,50	67,34±0,01 <sup>c</sup>	-154,69±1,51

Letras diferentes, dentro de una misma columna y para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

\* La ausencia de letras indica que no se registraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

Energía de activación para la inactivación térmica: 115,85±0,81 kJ/mol para *Alcalase*® y 20,04±0,50 kJ/mol para *Flavourzyme*®.

Por su parte, la entropía de inactivación constituye la energía por grado necesaria para que una enzima pase de su estado nativo a un estado desnaturalizado. Como se mencionó previamente, valores positivos o negativos de entropía indican un aumento o una disminución de la aleatoriedad (o desorden), respectivamente, como consecuencia de la desnaturalización. En

general, grandes cambios en valores absolutos en la entropía, tanto hacia valores muy positivos como muy negativos, suelen estar relacionados a una enzima menos estable. Cuando el cambio es muy positivo se aprecia una desnaturalización por desplegamiento de la estructura terciaria, mientras que, transiciones hacia valores negativos de entropía indicarían desnaturalización por agregación (Bhunia et al., 2013).

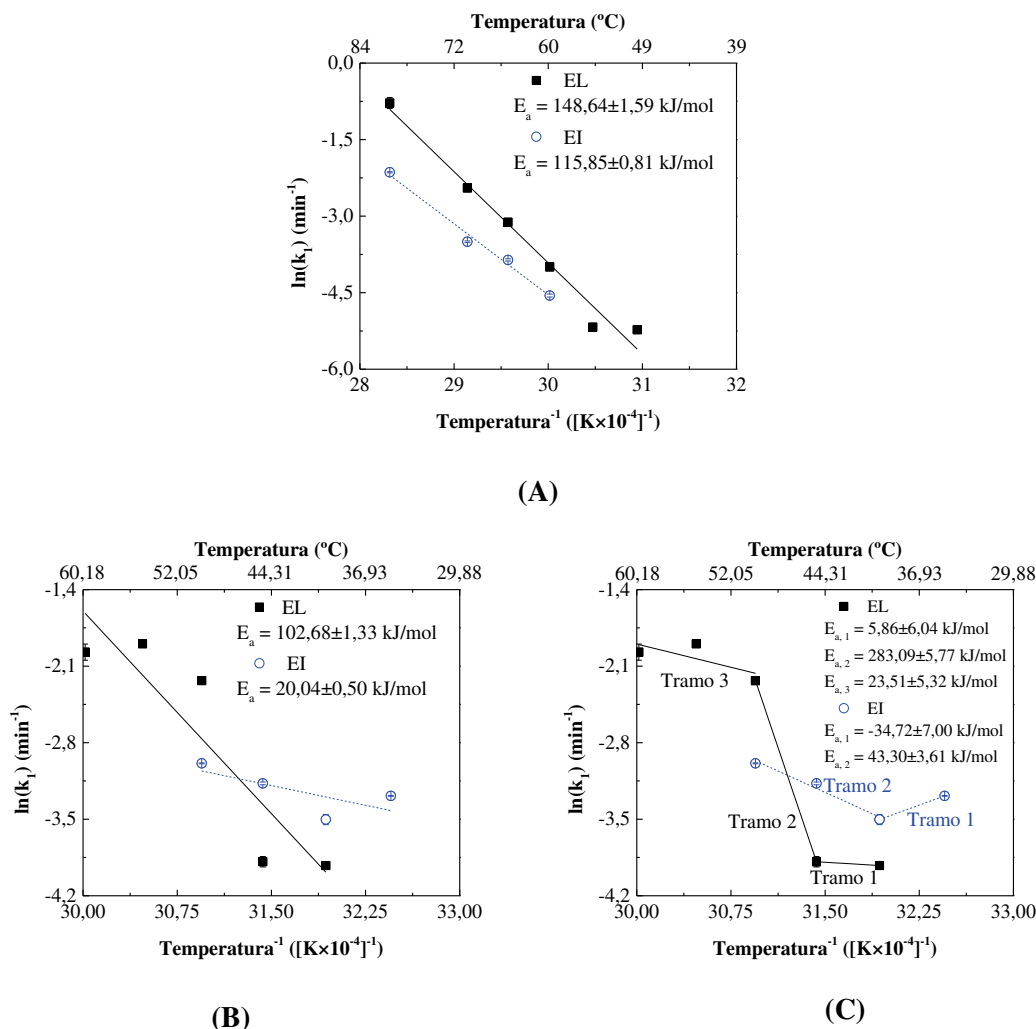


Figura 49. Gráfica de Arrhenius de Alcalase® (A) y Flavourzyme® (B y C) en estado libre (EL) e inmovilizado (EI).

Alcalase® registró valores positivos de entropía de 118 J/mol·K, lo que indica un aumento de la aleatoriedad como consecuencia de la desnaturalización. Sin embargo, el valor obtenido fue menor al registrado por la enzima en estado libre (222 J/mol·K), posiblemente asociado a un ordenamiento de la estructura enzimática debido a la inmovilización propiamente dicha. A su vez, es posible apreciar que no se presentaron grandes cambios entrópicos al no registrarse diferencias significativas entre los valores obtenidos a las temperaturas evaluadas, lo que sugiere un comportamiento estable de la enzima. En el caso de Flavourzyme®, la entropía

resultó negativa con un valor promedio de  $-155 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ , lo que difiere del presentado por la enzima en estado libre ( $103 \text{ J/mol}\cdot\text{K}$ ). Como se indicó con *Alcalase*®, probablemente la inmovilización condujo a una estructura enzimática menos flexible que se reflejó en una menor aleatoriedad (Abdel-Naby et al., 2017).

En relación a la energía libre de Gibbs esta abarca las contribuciones tanto de la entalpía como de la entropía. Como se ha mencionado en la sección de caracterización de las enzimas en estado libre, valores negativos o bajos se asocian con la espontaneidad de la desnaturalización, es decir, la enzima se desnaturaliza fácilmente (Bhunja et al., 2013). En los resultados obtenidos, las enzimas inmovilizadas mostraron valores positivos de energía libre, de 71 a 74 kJ/mol en el caso de *Alcalase*® y de 65 a 67 kJ/mol en el caso de *Flavourzyme*®. En comparación con los resultados obtenidos para las enzimas libres (*Alcalase*® libre: 67-74 kJ/mol; *Flavourzyme*® libre: 65-69 kJ/mol), la inmovilización no mostró un efecto importante sobre la energía libre, ya que los valores obtenidos fueron similares en ambos casos. Como se indicó para las enzimas en estado libre, estos valores reflejan que la desnaturalización no es espontánea, es decir, se requiere de una fuerza externa (como el aumento de la temperatura) para que ocurra. A su vez, se observa una disminución significativa de la energía libre de *Alcalase*® como consecuencia del aumento de la temperatura, lo que sugiere que la desnaturalización se vuelve más favorable a temperaturas más altas, algo esperable en procesos térmicos de inactivación enzimática.

En cuanto a la energía de inactivación térmica, se obtuvo un valor de  $115,85 \pm 0,81 \text{ kJ/mol}$  para *Alcalase*® y de  $20,04 \pm 0,50 \text{ kJ/mol}$  para *Flavourzyme*®. Teniendo en cuenta que la energía de activación para la inactivación enzimática es un criterio clave para evaluar la estabilidad térmica de las proteínas, ya que, a mayor energía de desnaturalización, mayor es la estabilidad de la enzima (Abdel-Naby et al., 2017), la mayor  $E_a$  registrada para *Alcalase*® sugiere una mayor resistencia a la desnaturalización térmica en comparación con *Flavourzyme*®. Esto indicaría que *Alcalase*® inmovilizada es más estable a las temperaturas evaluadas. Estos resultados también se observaron con las enzimas en estado libre (**Figura 49**). Además, al comparar los valores obtenidos, las enzimas inmovilizadas mostraron valores de energía de activación para la inactivación menores que las enzimas libres (*Alcalase*®:  $148,64 \pm 1,59 \text{ kJ/mol}$ ; *Flavourzyme*®:  $102,68 \pm 1,33 \text{ kJ/mol}$ ). Este resultado puede atribuirse al rango de temperatura evaluado y a la presencia de una fracción residual estable en la enzima inmovilizada, que conserva actividad a lo largo del tiempo pese a una inactivación inicial más pronunciada.

En la bibliografía se han reportado resultados similares (Rha et al., 2005; Pal & Khanum, 2011) y con algunas diferencias (Rodríguez-Nogales & Delgadillo, 2005; Catana et al., 2007; Pal & Khanum, 2011) a los obtenidos en el presente estudio, al analizar parámetros derivados de la ecuación de Arrhenius en enzimas inmovilizadas, diferentes de *Alcalase*® y *Flavourzyme*®. Las

diferencias pueden atribuirse al tipo de enzima, método de inmovilización y soporte utilizado, así como a los cambios conformacionales inducidos en cada caso.

Como se indicó previamente, el análisis de los datos de *Flavourzyme*® también involucró la regresión por tramos (**Figura 49.C y Tabla 25**). Al igual que *Alcalase*®, *Flavourzyme*® mostró una gran estabilidad a las temperaturas evaluadas, con valores positivos tanto de entalpía como de energía libre de Gibbs. Sin embargo, los valores de entropía resultaron negativos, lo que podría estar relacionado con un incremento en la resistencia a la desnaturalización, debido a la presencia de una estructura terciaria más compacta y ordenada (Gummadi, 2003; Bhunia et al., 2013). En el tramo 1 (35-40°C), la temperatura podría no ser suficiente para inducir un despliegue significativo de la enzima, como también se observó en el estado libre. A su vez, la inmovilización intensificó este efecto ya que, dentro del mismo rango de temperaturas, la entropía negativa fue mayor en la enzima inmovilizada (-332 J/mol·K, 35-40°C) en comparación con la enzima libre (-172 J/mol·K, 40-45°C). Este comportamiento también fue observado por Karam et al. (2017), quienes al inmovilizar amilasa reportaron que una entropía más negativa en la enzima inmovilizada, respecto de la forma libre, indica una estructura más ordenada. No obstante, en este caso, la entropía negativa no necesariamente implicaría una mayor estabilidad estructural frente a la desnaturalización, sino que podría estar relacionada también con procesos de agregación promovidos por la hidrofobicidad intrínseca de *Flavourzyme*®. Al ser inmovilizada y perder los estabilizadores que posee en solución, la enzima podría tender a agregarse, especialmente al aumentar la temperatura. Esta agregación, más que un despliegue estructural completo, sería una de las causas principales de inactivación, al ocultar los sitios activos y dificultar el acceso del sustrato.

**Tabla 25.** Parámetros de inactivación térmica de *Flavourzyme*® en estado inmovilizado (pH 7,5), según el modelo de Arrhenius, evaluada en tramos.

Tramo	Temperatura (°C)	$\Delta H$ (kJ/mol)*	$\Delta G$ (kJ/mol)	$\Delta S$ (J/mol)*
1	35	-37,28±7,00	65,10±0,01 <sup>a</sup>	-332,24±22,69
	40	-37,32±7,00	66,68±0,12 <sup>b</sup>	-332,10±21,96
2	40	40,70±3,61	66,68±0,12 <sup>a</sup>	-82,97±11,91
	45	40,65±3,61	66,83±0,03 <sup>a</sup>	-82,26±11,44
	50	40,61±3,61	67,34±0,01 <sup>b</sup>	-82,71±11,13

Letras diferentes, dentro de una misma columna para cada tramo, indican diferencias significativas (p<0,05).

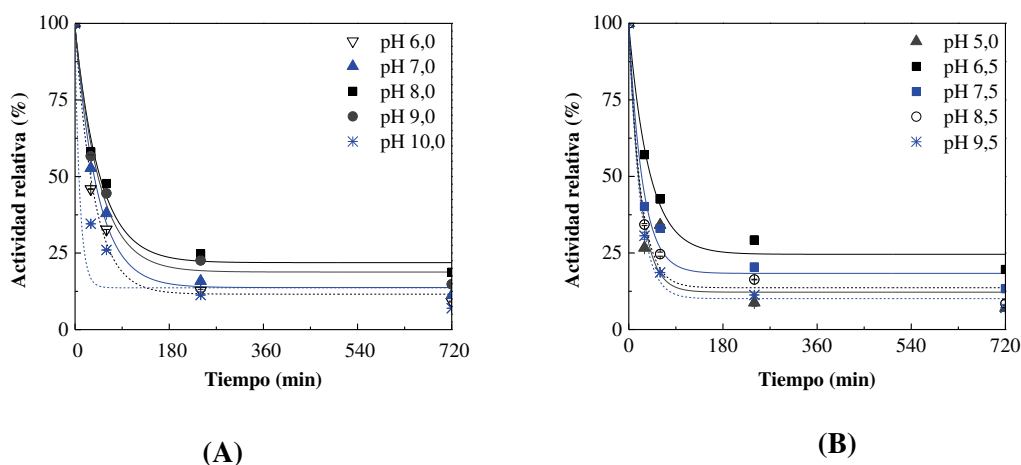
\* La ausencia de letras indica que no se registraron diferencias significativas (p>0,05).

Energía de activación para la inactivación térmica: 35-40°C:  $-34,72 \pm 7,00$  kJ/mol, 40-50°C:  $43,30 \pm 3,61$  kJ/mol.

En este mismo tramo (35-40°C), también se observaron valores negativos de entalpía, lo que indicaría que la enzima libera calor a medida que se desnaturaliza. Es decir, el proceso es termodinámicamente favorable o tiende a ocurrir de manera espontánea. Sin embargo, la combinación de entalpía y entropía negativas sugiere que más que una desnaturalización completa, se trata de un proceso de inactivación por agregación, que conlleva una transición hacia un estado más ordenado, pero catalíticamente inactivo. En el caso del tramo 2 (40-50°C), la entropía, si bien resultó negativa, tomó valores menores en comparación con el tramo 1. Esto sugiere que el aumento de la temperatura comienza a contrarrestar el efecto estabilizante de la inmovilización, favoreciendo parcialmente la desnaturalización de la enzima o, como se mencionó anteriormente, comienza a promover el despliegue de estructuras previamente compactadas como consecuencia de la inactivación por agregación.

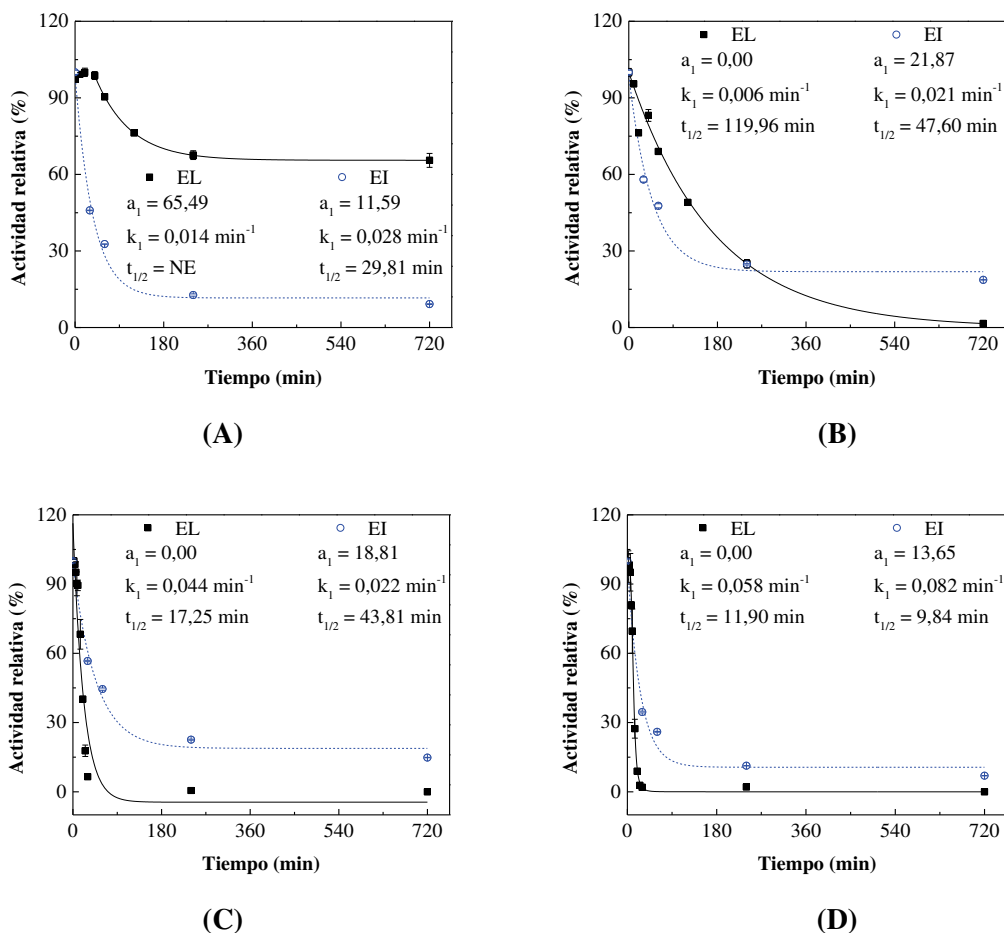
Finalmente, es importante mencionar que las diferencias en la energía de inactivación entre tramos (negativa en el tramo 1 y positiva en el tramo 2) son coherentes con la existencia de una transición conformacional dependiente de la temperatura, tal como se describió en el trabajo de Levitsky et al. (1994). Este modelo propone la presencia de dos formas estructurales: una forma nativa lábil a baja temperatura y una forma parcialmente desnaturalizada pero más resistente a la inactivación térmica. Como se mencionó en el análisis de los datos de estabilidad con la enzima libre, este comportamiento presentado por *Flavourzyme*® estaría relacionado con el hecho de que la preparación comercial es una mezcla de proteasas. En esta dirección, la inmovilización covalente con la química y el soporte estudiadas pudo haber provocado que no todas las unidades enzimáticas estructurales con actividades diferentes hayan sido inmovilizadas de igual forma ni en cantidad, produciendo comportamientos diferenciales en relación a la estabilidad térmica. En otras palabras, el efecto de la temperatura podría variar en cada una de ellas. Esto probablemente lleva a efectos de estabilización o desestabilización que expliquen el comportamiento no lineal observado en *Flavourzyme*® tanto en estado libre como inmovilizado. Asimismo, y explicado por los cambios en la energía libre de los derivados, la presencia de inhibidores o activadores en la preparación comercial tendrían influencia sobre los parámetros termodinámicos analizados, dado que en los derivados inmovilizados estos estabilizantes no se encontraron presentes. Además, es factible que una enzima se comporte como activador de otra en presencia del sustrato en estudio, pero al realizar la inmovilización, la insolubilización de ciertas unidades proteicas por sobre otras, generó alteraciones conformacionales cuyos resultados arrojaron el comportamiento apreciado para el caso de *Flavourzyme*®.

Para complementar los estudios de estabilidad térmica, se evaluó la actividad residual de las enzimas pre-incubadas a diferentes valores de pH y tiempos. Los resultados también se expresaron como actividad relativa en relación con la actividad inicial registrada en el tiempo cero y se presentan en la **Figura 50** (Tablas A7.5 y A7.6, Anexo 7). Es posible observar que la actividad de las enzimas se redujo con el incremento del tiempo de pre-incubación. En cuanto al aumento del pH, la actividad enzimática aumentó hasta alcanzar un valor determinado, a partir del cual, con un mayor incremento del pH, comenzó a disminuir. Este valor fue pH 8 para *Alcalase*® y pH 6,5 para *Flavourzyme*®, los cuales difieren y coinciden, respectivamente, con los observados con las enzimas en estado libre (*Alcalase*®: pH 6 y 8,5; *Flavourzyme*®: pH 6,5 y 8).



**Figura 50.** Estabilidad frente al pH de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado inmovilizado.

En particular, el derivado de *Alcalase*® mantuvo aproximadamente un 50% de la actividad inicial luego de 30-60 min de pre-incubación a los pH evaluados, excepto a pH 10 donde a los 30 min la actividad residual fue del 35%, aproximadamente. En comparación con la enzima en su estado libre (**Figura 51**), estos resultados fueron menores. Por ejemplo, luego de 60 min de pre-incubación a pH 6, la enzima libre mantuvo un 90% de su actividad inicial, mientras que, la enzima inmovilizada mostró tan sólo un 32% de actividad residual. Sin embargo, a pH 10, el derivado registró valores de actividad residual superiores al 10% hasta 240 min de pre-incubación, mientras que, la enzima libre logró dicho porcentaje sólo hasta los 15 min de pre-incubación. Aslan et al. (2018) inmovilizaron una proteasa de *Bacillus licheniformis* (EC 3.4.21.14) en Eupergit GM y reportaron, a diferencia de lo observado en la presente tesis, que la inmovilización mejoró la estabilidad de la enzima frente al pH en todo el rango evaluado (pH 5-12), tras 1 h de incubación a temperatura ambiente. Cabe destacar que en dicho estudio se empleó una química de inmovilización distinta a la utilizada en este trabajo, además de condiciones de incubación diferentes (menor tiempo y temperatura), lo cual podría explicar algunas de las diferencias observadas en los resultados.

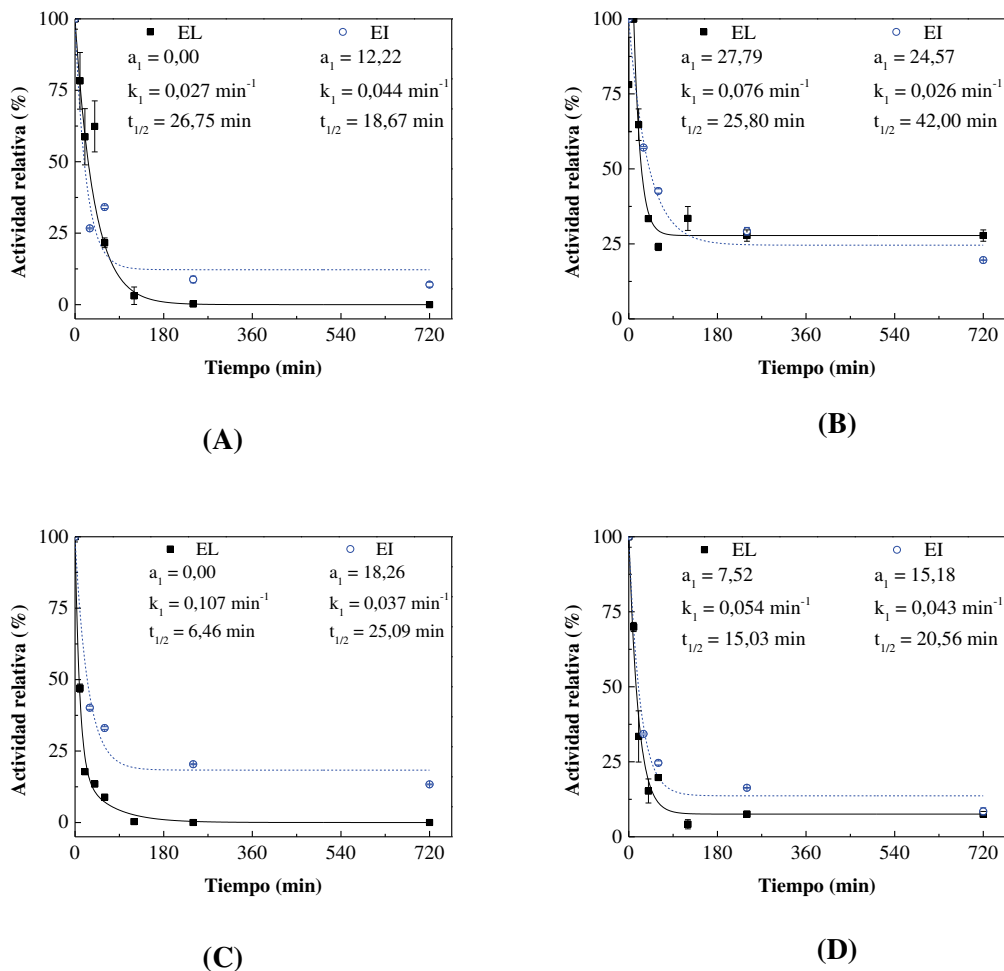


**Figura 51.** Estabilidad frente al pH de *Alcalase*® en estado libre (EL; 60°C) e inmovilizado (EI; 65°C). (A) pH 6. (B) pH 8. (C) pH 9. (D) pH 10.  $a_1 = \alpha_1$ . NE = no estimado. Los valores de actividad relativa en estado libre a 240 y 720 min se estimaron a partir de los datos proporcionados por las regresiones.

En cuanto a *Flavourzyme*®, la enzima inmovilizada mantuvo aproximadamente un 50% de la actividad inicial entre 30 y 60 min de pre-incubación sólo a pH 6,5. A dicho tiempo de pre-incubación, el derivado presentó una actividad residual menor al 40% en los demás valores de pH evaluados. En comparación con la enzima en su estado libre (**Figura 52**), estos resultados fueron en algunos casos similares y en otros mayores. Por ejemplo, luego de 60 min de incubación a pH 5, 6,5; 7,5 y 8,5, la enzima libre mantuvo un 22, 24, 9 y 20% de su actividad inicial, respectivamente, mientras que, la enzima inmovilizada mostró un 34, 43, 33 y 25% de actividad residual (valores mayores), respectivamente. Sin embargo, luego de 20-40 min de pre-incubación a pH 6,5 y 8,5, la enzima libre mantuvo entre un 33-65% y un 15-33% de su actividad inicial, respectivamente, mientras que, la enzima inmovilizada mostró un 57 y 34% de actividad residual (valores similares).

Otros autores también han reportado comportamientos distintos de *Flavourzyme*® en función del pH. Por ejemplo, su encapsulación en liposomas mostró menor estabilidad en

condiciones ácidas debido a la posible fuga enzimática (Vafabakhsh et al., 2013), mientras que su inmovilización sobre sílice modificada con quitosano y dopamina mejoró su estabilidad frente a un amplio rango de pH (Zhao et al., 2025).



**Figura 52.** Estabilidad térmica de *Flavourzyme*® en estado libre (EL; 45°C) e inmovilizado (EI; 35°C). (A) pH 5. (B) pH 6,5. (C) pH 7,5. (D) pH 8,5.  $a_1 = \alpha_1$ . Los valores de actividad relativa en estado libre a 240 y 720 min se estimaron a partir de los datos proporcionados por las regresiones.

Los parámetros de inactivación frente al pH, estimados a partir de los resultados obtenidos y siguiendo el modelo de Sadana-Henley, se presentan en la **Tabla 26**. En concordancia con lo señalado anteriormente, se observa un incremento del parámetro  $\alpha_1$  y del  $t_{1/2}$  como consecuencia del incremento del pH, pero sólo hasta el pH óptimo en el caso de *Alcalase*® (pH 8) y hasta pH 6,5 en el caso de *Flavourzyme*®. Luego, al continuar aumentando el pH se presenta una reducción de los valores de ambos parámetros. En cuanto al  $k_1$ , no se presentaron diferencias significativas en el rango de pH de 6 a 9 para *Alcalase*®. Sin embargo, a pH 10 el valor de este parámetro fue el mayor alcanzado. Mientras que, en el caso de *Flavourzyme*® se observó un comportamiento similar al del parámetro  $\alpha_1$  y del  $t_{1/2}$ , pero en el sentido contrario. En otras palabras, el coeficiente

de inactivación se redujo al incrementar el pH hasta 6,5; sin embargo, un incremento posterior del pH provocó un nuevo aumento de esta constante.

**Tabla 26.** Parámetros de inactivación frente al pH de *Alcalase*® (65°C) y *Flavourzyme*® (35°C) en estado inmovilizado, según el modelo de Sadana-Henley.

Enzima	pH	$\alpha_1$	$k_1$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (min)
<i>Alcalase</i> ®	6	11,59±0,32 <sup>a</sup>	0,028±0,000 <sup>a</sup>	29,81±0,06 <sup>b</sup>
	7	13,73±0,60 <sup>b</sup>	0,023±0,001 <sup>a</sup>	36,59±0,02 <sup>c</sup>
	8	21,87±0,08 <sup>d</sup>	0,021±0,000 <sup>a</sup>	47,60±1,59 <sup>e</sup>
	9	18,81±0,18 <sup>c</sup>	0,022±0,000 <sup>a</sup>	43,81±0,59 <sup>d</sup>
	10	13,65±0,09 <sup>b</sup>	0,082±0,012 <sup>b</sup>	9,84±1,54 <sup>a</sup>
<i>Flavourzyme</i> ®	5,0	12,22±1,17 <sup>a</sup>	0,044±0,002 <sup>cd</sup>	18,67±0,27 <sup>a</sup>
	6,5	24,57±0,66 <sup>d</sup>	0,026±0,000 <sup>a</sup>	42,00±0,79 <sup>d</sup>
	7,5	18,26±0,20 <sup>c</sup>	0,037±0,000 <sup>b</sup>	25,09±0,21 <sup>c</sup>
	8,5	15,18±0,70 <sup>b</sup>	0,043±0,000 <sup>c</sup>	20,56±0,19 <sup>b</sup>
	9,5	11,70±0,44 <sup>a</sup>	0,046±0,001 <sup>d</sup>	18,01±0,58 <sup>a</sup>

Letras diferentes, dentro de una misma columna y para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados indican que *Alcalase*® inmovilizada presenta mayor estabilidad a pH 8, el mismo valor de pH que se obtuvo como pH óptimo para la hidrólisis de caseína. En relación con la comparación entre las formas libre e inmovilizada, si bien a pH 6 la enzima libre mostró una mayor estabilidad (mayor  $\alpha_1$ , menor  $k_1$  y mayor  $t_{1/2}$ ), a pH 9 se observó el efecto contrario, con mejores parámetros para la enzima inmovilizada. Por su parte, a pH 8 y 10, si bien la enzima libre mostró inicialmente un menor coeficiente de inactivación y mayor  $t_{1/2}$ , la inmovilizada presentó un valor de  $\alpha_1$  más alto, lo que se traduce en una mayor actividad retenida a tiempos prolongados, como se observa en el cruce de curvas de la **Figura 51**. Por lo tanto, los resultados indican que la inmovilización de la enzima no produjo una mejora uniforme en la estabilidad frente al pH, sino que su efecto varió en función del valor de pH evaluado. A pH 6, la forma libre presentó una mayor estabilidad, mientras que a pH 9 ocurrió lo contrario, y a pH 8 y 10 se observó una mejora relativa de la inmovilizada a tiempos prolongados. Estos comportamientos pueden explicarse por distintos factores. Por un lado, la inmovilización puede conferir cierta protección estructural frente a condiciones alcalinas, al restringir los movimientos conformacionales de la enzima e impedir cambios drásticos en su estructura terciaria. Por otro lado, la presencia de grupos

funcionales en el soporte podría generar un microambiente iónico que, ante ciertas condiciones de pH, afecte negativamente la estabilidad de la enzima. Alteraciones en la protonación de grupos funcionales del soporte o de la enzima inmovilizada podrían inducir modificaciones conformacionales sutiles o interferencias en el sitio activo, afectando negativamente su capacidad de recuperación catalítica al volver a condiciones óptimas de reacción. En consecuencia, los efectos de la inmovilización sobre la estabilidad frente al pH deben interpretarse como el resultado del equilibrio entre fenómenos protectores y factores desestabilizantes que varían según el contexto químico del medio.

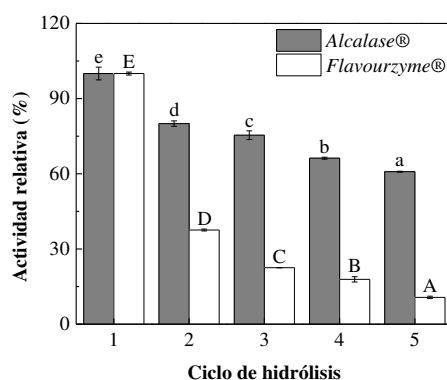
En el caso de *Flavourzyme*®, esta enzima inmovilizada presentó mayor estabilidad a pH 6,5, valor de pH que difiere del pH donde se observó la mayor hidrólisis de caseína (pH 7,0-7,5). Al comparar los datos con los obtenidos para la enzima en estado libre (**Figura 52**), se observa que la inmovilización confirió una mayor estabilidad a pH 7,5 y 8,5, evidenciada por un incremento en el valor del parámetro  $\alpha_1$ , una reducción del coeficiente de inactivación y un mayor tiempo de vida media. A pH 5, si bien la forma inmovilizada presentó un valor de  $\alpha_1$  más alto, la enzima libre mostró un menor valor de  $k_1$  y un mayor  $t_{1/2}$ , indicando una mejor estabilidad inicial, aunque con menor fracción activa retenida a tiempos prolongados. A pH 6,5, en cambio, se observó el comportamiento opuesto: la forma inmovilizada presentó una menor constante de inactivación y mayor tiempo de vida media, pero un valor de  $\alpha_1$  inferior al de la enzima libre. Esta variabilidad en la respuesta sugiere que la inmovilización confirió una mejora parcial en la estabilidad frente al pH, dependiendo del pH evaluado, con efectos más notables a pH cercanos a neutro y levemente alcalinos. Cabe destacar que los ensayos de estabilidad frente al pH para la enzima inmovilizada se realizaron a 35°C, mientras que los correspondientes a la enzima libre se efectuaron a 45°C, por lo que las diferencias observadas entre ambas condiciones deben considerarse también en función de esta diferencia experimental. Cabe señalar también, que a pH 5 se presentó una dificultad técnica asociada a la rápida erosión del soporte, lo que dificultó el pesaje preciso del derivado para la determinación de la actividad enzimática; por lo tanto, los resultados a este pH deben interpretarse con precaución.

Cabe destacar que, en la revisión bibliográfica realizada, no se hallaron estudios que analicen la estabilidad frente al pH en términos de parámetros de inactivación para *Alcalase*® y *Flavourzyme*®, tanto en su forma libre como inmovilizada, con excepción del trabajo de Blanco-Llamero et al. (2021), quienes observaron un incremento en el tiempo de vida media al evaluar la estabilidad de distintas versiones de *Alcalase*® insolubilizada mediante reticulación enzimática (CLEA), a 50 y 55 °C y pH 5 y 7. En este contexto, los estudios realizados sobre enzimas inmovilizadas en quitosano activado con glutaraldehído representan un aporte significativo, al ampliar y profundizar el conocimiento disponible sobre las enzimas empleadas.

#### 4.4.3. Estudios de estabilidad operacional

Una de las principales limitaciones en el uso industrial de las enzimas libres es su incapacidad de ser recuperadas y/o reutilizadas fácilmente después de la reacción de hidrólisis. Por ello, la estabilidad operacional se convierte en una característica clave a estudiar en los biocatalizadores insolubilizados, ya que determina su viabilidad en aplicaciones industriales a gran escala (Huu et al., 2014; Memon et al., 2019; dos Santos Kimberle et al., 2020; Ramalho & de Castro, 2023).

En la **Figura 53** se presentan los resultados obtenidos al evaluar la estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas. Se observó que tanto el derivado de *Alcalase*® como el de *Flavourzyme*® mostraron una disminución significativa de la actividad enzimática con cada ciclo de hidrólisis. Sin embargo, la actividad residual tras cinco ciclos fue superior en el derivado de *Alcalase*® en comparación con *Flavourzyme*®. En efecto, *Alcalase*® retuvo aproximadamente el 61% de su actividad inicial después de cinco ciclos consecutivos de hidrólisis de caseína realizados a 70°C y pH 8 durante 10 min, mientras que *Flavourzyme*®, ensayado a 50°C y pH 7,5 durante el mismo tiempo de incubación, solo conservó cerca del 11% de la actividad inicial registrada.



**Figura 53.** Estabilidad operativa de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado inmovilizado. Letras minúsculas (*Alcalase*®) o mayúsculas (*Flavourzyme*®) diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la bibliografía se han reportado valores similares (Huu et al., 2014), mayores (Wang et al., 2014; Pessato et al., 2016; Aslan et al., 2018; Liao & Huang, 2019; Memon et al., 2019; dos Santos Kimberle et al., 2020; Zhao et al., 2025) e incluso menores (Yang et al., 2017) a los obtenidos en el presente trabajo. Las diferencias observadas podrían atribuirse tanto a las condiciones de hidrólisis utilizadas [por ejemplo, temperaturas más bajas en algunos estudios, como los 32°C empleados por dos Santos Kimberle et al. (2020)] como al tipo de sustrato utilizado [como en el caso de Pessato et al. (2016), quienes emplearon aislado de proteína de suero en lugar

de caseína], así como a las distintas técnicas de inmovilización aplicadas [por ejemplo, reticulación tipo CLEA con diferentes agentes precipitantes por dos Santos Kimberle et al. (2020), o el uso de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recubiertas con quitosano por Wang et al. (2014)].

Del análisis conjunto de los estudios se destaca que la pérdida de actividad de los biocatalizadores inmovilizados suele asociarse a la presencia de uniones débiles entre la enzima y el soporte, lo que facilita su lixiviación durante los ciclos de uso y lavado (Huu et al., 2014; Wang et al., 2014; Yang et al., 2017; Liao & Huang, 2019), así como a procesos de desnaturalización o a cambios conformacionales de la enzima durante la hidrólisis (Huu et al., 2014; Wang et al., 2014; Liao & Huang, 2019).

En función de los datos obtenidos y de lo informado en la bibliografía, se considera que la pérdida progresiva de actividad observada podría deberse a la fuga de moléculas de enzima unidas débilmente al soporte, así como a la posible inactivación térmica bajo las condiciones exigentes de reacción. Ambos fenómenos representan desafíos clave para la implementación industrial de enzimas inmovilizadas (Coríci et al., 2011).

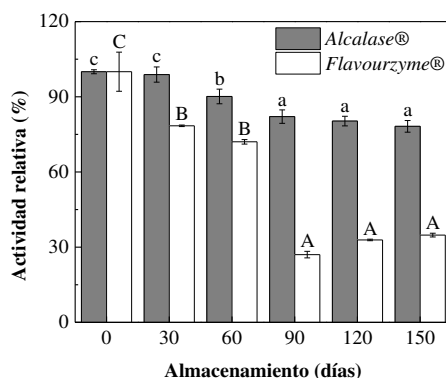
En este contexto, los resultados obtenidos para *Alcalase*® son alentadores en comparación con los de *Flavourzyme*®. Tras cinco ciclos consecutivos de hidrólisis a 70°C, *Alcalase*® retuvo más del 50% de su actividad inicial, cuando su estabilidad térmica a esa misma temperatura había mostrado una actividad residual de aproximadamente un 42% y un 34% a los 30 y 60 min de incubación, respectivamente. Esto datos sugieren, por un lado, un efecto estabilizante del sustrato sobre la enzima durante la hidrólisis y, por otro lado, una buena estabilidad operativa del derivado sintetizado. Esto último permitiría reducir costos en procesos industriales, en comparación con el uso de la enzima en estado libre, la cual, entre otras desventajas, presenta como limitante la imposibilidad de ser recuperada y reutilizada fácilmente (Bhandari et al., 2009; Huu et al., 2014; Yang et al. 2017; dos Santos Kimberle et al., 2020; Ramalho & de Castro, 2023). En cuanto a *Flavourzyme*®, se considera que aún son necesarias mejoras en el proceso de inmovilización para lograr una reutilización eficiente con una pérdida mínima de actividad, aspecto clave para futuras aplicaciones industriales y para incrementar la viabilidad de su implementación a gran escala (Coríci et al., 2011; Liao & Huang, 2019; Memon et al., 2019; dos Santos Kimberle et al., 2020).

#### **4.4.4. Evaluación de la estabilidad durante el almacenamiento**

La estabilidad de las enzimas durante el almacenamiento es un aspecto clave desde el punto de vista industrial, ya que condiciona su viabilidad como biocatalizadores en procesos a escala productiva (Darwesh al., 2020). Asimismo, las características del soporte insolubilizador

de la enzima, el quitosano, pueden verse afectadas por su naturaleza como biopolímero, lo que puede llevar a su degradación o contaminación.

La **Figura 54** muestra la evolución de la actividad enzimática durante el almacenamiento a 4°C de las enzimas inmovilizadas sintetizadas. En el caso de *Alcalase*®, el derivado inmovilizado mantuvo su actividad inicial durante los primeros 30 días, observándose una disminución a aproximadamente un 90% y un 80% de la actividad inicial tras 60 y 90 días, respectivamente, alcanzando un tiempo de vida media de  $318 \pm 20$  días (aproximadamente 10 meses y 18 días). Por su parte, el derivado de *Flavourzyme*® mostró una pérdida de actividad más pronunciada, alcanzando cerca del 80% a los 30 días y reduciéndose hasta un 20% a los 90 días de almacenamiento, con un tiempo de vida media de  $71 \pm 1$  días (alrededor de 2 meses y 11 días). Esto refleja una pérdida de actividad más rápida en comparación con *Alcalase*®.



**Figura 54.** Estabilidad durante el almacenamiento de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado inmovilizado. Letras minúsculas (*Alcalase*®) o mayúsculas (*Flavourzyme*®) diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

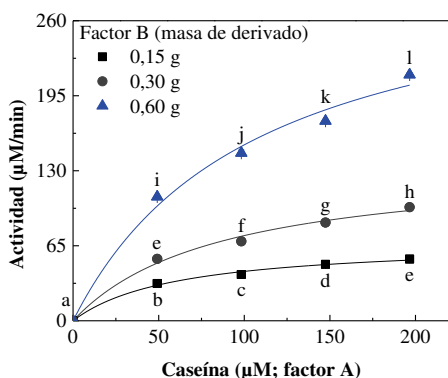
En la bibliografía se han reportado estabilidades enzimáticas similares o inferiores a las obtenidas en este estudio para *Alcalase*® y *Flavourzyme*®, tanto al trabajar con las mismas enzimas como con otras provenientes de los mismos microorganismos: *Bacillus licheniformis* y *Aspergillus oryzae* (Ferreira et al., 2003; Anjani et al., 2007; Madadlou et al., 2010; Yang et al., 2017; Aslan et al., 2018). Las diferencias observadas pueden atribuirse, al menos en parte, a las metodologías de inmovilización y a las condiciones específicas de almacenamiento. Por ejemplo, Ferreira et al. (2003) utilizaron una temperatura de almacenamiento más alta (25°C), lo que podría haber contribuido a una mayor pérdida de actividad enzimática y explicaría la menor estabilidad observada durante el almacenamiento.

Es importante mencionar que, tras 120 días de almacenamiento, los derivados mostraron visualmente la presencia de hongos, a pesar de que se utilizó un inhibidor de microorganismo durante el proceso de fabricación de las partículas (azida sódica). Esta observación remarca la

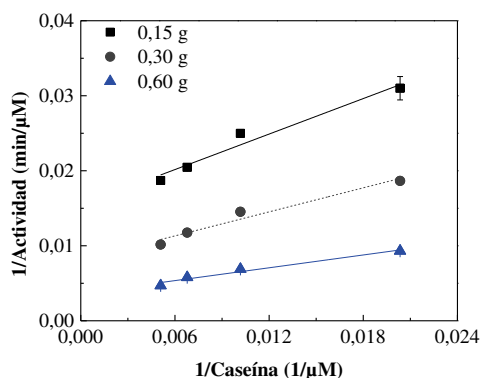
necesidad de investigar tratamientos post-inmovilización adecuados o condiciones de almacenamiento específicas que permitan inhibir o retrasar el crecimiento de microorganismos, sin comprometer significativamente la actividad catalítica de los biocatalizadores insolubilizados.

4.4.5. Estudios cinéticos

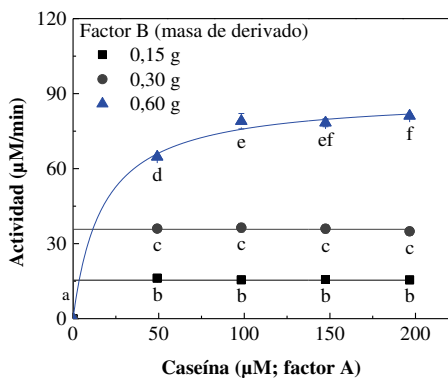
La caracterización cinética de enzimas inmovilizadas constituye una etapa importante para comprender cómo el proceso de inmovilización afecta su comportamiento catalítico. A través del estudio de parámetros como la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), es posible evaluar cambios en la afinidad de la enzima por el sustrato y la influencia del soporte en la accesibilidad del sustrato al sitio activo (Freitas et al., 2011). Asimismo, comparar estos valores con los obtenidos para las enzimas en su forma libre permite identificar posibles limitaciones en la difusión de sustrato, alteraciones estructurales o efectos del microambiente generado por el soporte (Pereira et al., 2001). Para ello, la actividad de las enzimas insolubilizadas evaluada con distintas concentraciones de caseína y distintas masas de derivado se presenta en la **Figura 55**.



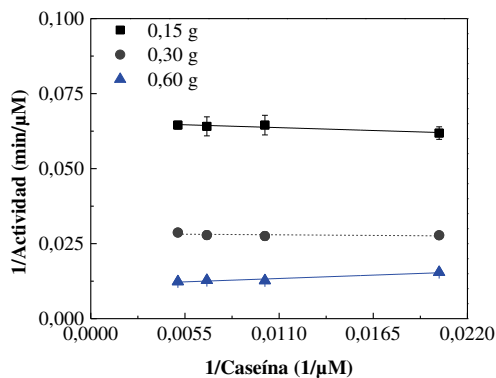
(A1)



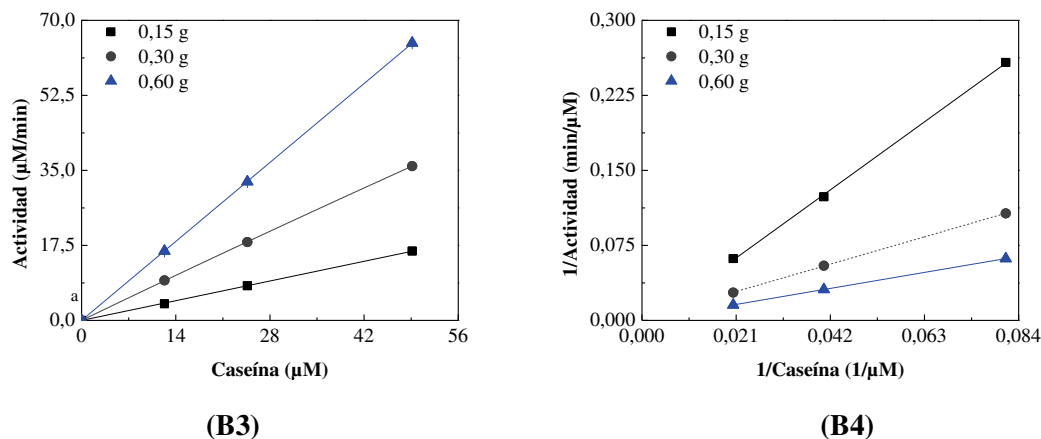
(A2)



(B1)



(B2)



**Figura 55.** Comportamiento de la actividad enzimática de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado inmovilizado, frente a distintas concentraciones de sustrato y masas de derivado. (1) Ajuste de las curvas según los modelos de Michaelis-Menten. (2) y (4) Representación lineal mediante la inversión de los ejes (doble recíproco). (3) Simulación a concentraciones bajas de sustrato para *Flavourzyme*®. Resultados del ANOVA de múltiples vías, correspondientes a las figuras (A1) y (B1): -factores A y B e interacción AB: \*; -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En ambas enzimas se observa un aumento de la actividad enzimática al incrementar la masa de derivado. Sin embargo, al modificar la concentración de sustrato, sólo se evidenciaron cambios significativos en la actividad de *Alcalase*®. En el caso de *Flavourzyme*®, la influencia de la concentración de sustrato únicamente se evidenció cuando se empleó la mayor masa de derivado (0,6 g), sin observarse variaciones significativas en las otras masas de derivado utilizadas. El comportamiento observado en *Alcalase*® inmovilizada fue similar al observado con la enzima en estado libre. Sin embargo, con *Flavourzyme*® no se observaron similitudes en relación al efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la enzima.

Los parámetros cinéticos estimados a partir de los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 27**. El incremento de la masa de derivado provocó un aumento tanto de la  $V_{max}$  como en la  $K_m$ . Este comportamiento también se observó en las enzimas en estado libre (**Figura 56**), donde se consideró que el aumento de  $V_{max}$  está posiblemente relacionado con su dependencia directa de la concentración enzimática. Un mayor número de sitios activos disponibles da lugar a una mayor velocidad de reacción. Mientras que, en el caso de la  $K_m$ , su incremento refleja una menor afinidad de la enzima por el sustrato (da Silva & de Castro, 2018), lo cual podría estar asociado a la presencia de una inhibición por producto. En este sentido, se observó que el tipo de inhibición varía entre las enzimas estudiadas: en el caso de *Alcalase*®, se evidenció una inhibición acompetitiva (**Figura 55.A2**); para *Flavourzyme*®, sin embargo, las concentraciones de sustrato utilizadas inicialmente fueron saturantes, por lo que la velocidad de reacción apenas varió, dificultando la caracterización del tipo de inhibición. Ante esta situación, se realizaron

simulaciones a concentraciones más bajas de sustrato (**Figura 55.B3**), lo que permitió observar un comportamiento compatible con una inhibición mixta (**Figura 55.B4**), lo cual es coherente considerando que *Flavourzyme*® es una mezcla de enzimas con múltiples sitios activos y mecanismos de acción.

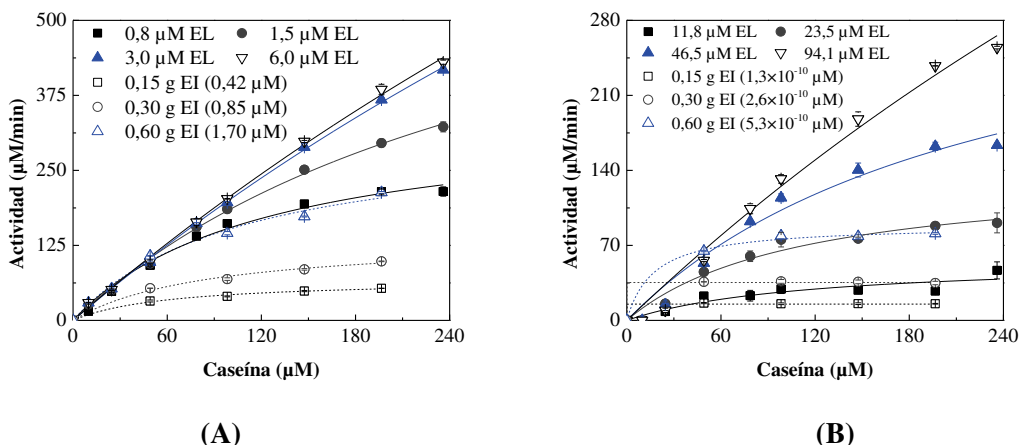
**Tabla 27.** Parámetros cinéticos de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado inmovilizado.

Enzima	Enzima inmvilizada		V <sub>max</sub> (μM/min)	K <sub>m</sub> (μM)
	(g)	(μM)		
<i>Alcalase</i> ®	0,15	1,4×10 <sup>-11</sup>	68,84±2,20 <sup>a</sup>	61,02±9,30 <sup>a</sup>
	0,30	2,9×10 <sup>-11</sup>	137,35±0,96 <sup>b</sup>	86,06±1,37 <sup>b</sup>
	0,60	5,7×10 <sup>-11</sup>	314,84±0,69 <sup>c</sup>	106,55±1,53 <sup>c</sup>
<i>Flavourzyme</i> ®	0,15	1,3×10 <sup>-10</sup>	15,32±0,68 <sup>a</sup>	2,6×10 <sup>-13</sup> ±3,7×10 <sup>-13a</sup>
	0,30	2,6×10 <sup>-10</sup>	35,54±2,17 <sup>b</sup>	0,46±0,66 <sup>a</sup>
	0,60	5,3×10 <sup>-10</sup>	88,97±1,79 <sup>c</sup>	17,18±0,00 <sup>b</sup>

Letras diferentes, dentro de una misma columna para cada enzima, indican diferencias significativas (p<0,05).

Al comparar los resultados obtenidos entre el estado libre y el estado inmovilizado, se puede apreciar una reducción en los valores de K<sub>m</sub> y V<sub>max</sub> tras la inmovilización en ambas enzimas. Para *Alcalase*®, el rango de la K<sub>m</sub> disminuyó de 122-1098 a 61-106 μM, mientras que el de V<sub>max</sub> se redujo de 343-2475 a 69-315 μM/min. En el caso de *Flavourzyme*®, los valores de K<sub>m</sub> pasaron de 33-124 μM a un rango de 2,6×10<sup>-13</sup>-17,18 μM, y los valores de V<sub>max</sub> disminuyeron de 28-334 a 15-89 μM/min.

En la bibliografía se han reportado efectos similares o diferentes a los observados en este estudio respecto a los parámetros cinéticos tras la inmovilización de *Alcalase*® o de proteasas derivadas del mismo microorganismo (*Bacillus licheniformis*). En algunos casos se observó una disminución en el valor de K<sub>m</sub>, lo que sugiere un aumento en la afinidad enzima-sustrato (Ferreira et al., 2003; Memon et al., 2019), mientras que en otros se reportó un incremento en dicho parámetro (Coríci et al., 2011; Wang et al., 2014; Aslan et al., 2018). Este aumento ha sido atribuido a distintas causas, entre ellas: limitaciones en la difusión de masa impuestas por la matriz de inmovilización (Coríci et al., 2011; Wang et al., 2014), impedimentos estéricos en el sitio activo o pérdida de flexibilidad estructural de la enzima (Aslan et al., 2018).



**Figura 56.** Comportamiento de la actividad enzimática de *Alcalase*® (A) y *Flavourzyme*® (B) en estado libre (EL) e inmovilizado (EI), frente a distintas concentraciones de sustrato y enzima.

En relación con *Flavourzyme*®, la bibliografía disponible reporta resultados diferentes a los obtenidos en este estudio, con un aumento en el valor de  $K_m$  tras la inmovilización (Madadlou et al., 2010; Vafabakhsh et al., 2013; Liao & Huang, 2019; Zhao et al., 2025). Este incremento, al igual que lo reportado en la literatura relacionada con *Alcalase*®, ha sido asociado a una disminución en la afinidad de la enzima por el sustrato, atribuida a impedimentos estéricos provocados por la matriz de inmovilización, pérdida de flexibilidad estructural y/o modificaciones conformacionales que podrían afectar la orientación de la enzima y reducir la accesibilidad del sustrato al sitio activo.

#### 4.5. Evaluación tecnológica de los hidrolizados obtenidos empleando los derivados sintetizados

Una vez determinadas las condiciones óptimas de inmovilización, los biocatalizadores insolubles sintetizados se aplicaron al proceso de hidrólisis de concentrado de proteínas de suero para evaluar su desempeño a una mayor escala. Esta etapa validó la funcionalidad de los derivados y permitió obtener hidrolizados con potencial para el desarrollo de ingredientes bioactivos.

Como se detalló en la sección materiales y métodos, en una primera instancia se realizaron pruebas de hidrólisis preliminares antes de proceder con el escalado. En una segunda instancia, los hidrolizados obtenidos fueron sometidos o no a un tratamiento térmico post-hidrólisis, secados mediante dos técnicas diferentes (liofilización y secado por aspersión), y evaluados en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, funcionales y biológicas.

#### **4.5.1. Obtención cuantitativa de hidrolizados**

Las reacciones de hidrólisis de la solución de WPC8% con enzimas inmovilizadas se desarrollaron siguiendo el protocolo actualizado propuesto oportunamente por Eberhardt et al. (2025), con el fin de emular la obtención de hidrolizados con enzimas en estado libre. Este enfoque contempla la obtención de dos hidrolizados diferentes: uno mediante la acción exclusiva de *Alcalase*® y otro a través de una hidrólisis secuencial, iniciando con *Alcalase*® y continuando con *Flavourzyme*®. La implementación de este esquema experimental respondió a la necesidad de adoptar estrategias más recientes y optimizadas, basadas en algunos resultados obtenidos en el marco de la tesis de la Dra. Eberhardt (Eberhardt, 2025), en la cual dichas estrategias fueron aplicadas utilizando las enzimas en estado libre y cuyos hidrolizados han demostrado interesantes propiedades bioquímicas, funcionales y biológicas (hecho que llevó incluso a testear la incorporación de dichos hidrolizados como ingredientes en una formulación alimenticia de base láctea). En otras palabras, para el presente trabajo de tesis se propuso obtener esos hidrolizados, pero utilizando ambas enzimas en forma inmovilizada, de manera tal de evaluar la factibilidad de llevar a cabo un posible escalado del proceso.

##### *4.5.1.1. Pruebas preliminares*

La hidrólisis de la solución de WPC8% con *Alcalase*® en estado libre se llevó a cabo a 50°C durante 1 h, respetando la relación enzima/proteína del WPC-80 de 2% (m/m) para lograr la obtención del primer hidrolizado, denominado WPH-A. Mientras que, la hidrólisis del WPH-A (para obtener WPH-AF) implicó adicionar *Flavourzyme*® en estado libre y continuar con la reacción a 50°C durante 2 h adicionales, utilizando una relación enzima/proteína del WPC-80 de 5,5% (m/m), completando de esta forma un tiempo total de hidrólisis de 3 h. En estas condiciones, Eberhardt et al. (2025) obtuvieron dos ingredientes con DH del 15 y 19%, respectivamente. Considerando, por un lado, que *Alcalase*® en estado libre conservó aproximadamente el 78% y el 27% de su actividad inicial tras 60 min de incubación a 55 y 60°C, respectivamente; mientras que, en estado inmovilizado, retuvo alrededor del 71% de su actividad inicial después 60 min de incubación a 60°C, no sólo se evaluó la hidrólisis catalizada por este derivado a 50°C, sino también a 55 y 60°C. En el caso de *Flavourzyme*®, dado que en estado libre mantuvo apenas un 0,3% de su actividad inicial tras 120 min de incubación a 50°C, y en estado inmovilizado conservó aproximadamente un 4% luego de 240 min a la misma temperatura, la hidrólisis del WPH-A se evaluó a 50°C y a una temperatura inferior. Dicha temperatura fue 45°C, a la cual la enzima libre e inmovilizada retuvo aproximadamente un 23% y un 8% de su actividad inicial tras 120 y 240 de min de incubación, respectivamente.

Por otro lado, dado que las condiciones de inmovilización seleccionadas para *Alcalase*® y *Flavourzyme*® indicaron aproximadamente un 92% y un 65% de rendimiento de inmovilización

en términos de proteína, serían necesarios 4,61 y 1,28 g de derivado, respectivamente, para lograr las relaciones enzima/proteína del WPC-80 (m/m) mencionadas con anterioridad. Por lo tanto, 5 g de derivado de *Alcalase*® para 60 ml de la solución de WPC8% [2,2% (m/m)] y 2 g de derivado de *Flavourzyme*® para 60 ml de WPH-A [8,6% (m/m)] fueron las masas de derivado de partida para las pruebas preliminares. Luego, se evaluaron masas superiores [10 y 15 g para *Alcalase*®; 4,3 y 6,5% (m/m), respectivamente; y 5 y 8 g para *Flavourzyme*®; 21,5 y 34,4% (m/m), respectivamente] con el fin de alcanzar los DH obtenidos con las enzimas libres en tiempos comprobables a los estudios previos.

En la **Tabla 28** se presentan los grados de hidrólisis alcanzados y los tiempos requeridos en los ensayos preliminares realizados con distintas masas de enzimas inmovilizadas bajo diferentes condiciones de temperatura. Se observa que, en algunos casos, el aumento de la masa del derivado enzimático incrementó el grado de hidrólisis (*Alcalase*®: de 6,71% con 5 g a 11,00% con 15 g a 50°C; *Flavourzyme*®: de 3,24% con 5 g a 4,29% con 8 g a 50°C), mientras que, en otros, no se evidenciaron cambios importantes (*Alcalase*®: de 14,80% con 10 g a 15,56% con 15 g a 60°C; *Flavourzyme*®: de 2,01% con 2 g a 2,55% con 5 g a 45°C). Asimismo, en varios ensayos se observó una reducción del tiempo necesario para alcanzar grados de hidrólisis similares como, por ejemplo, con 10 (15,03%) y 15 g (14,92%) de *Alcalase*® a 60°C, el tiempo se redujo de 120 a 85 min, respectivamente. En cuanto al efecto de la temperatura, un aumento moderado condujo a mayores grados de hidrólisis en tiempos más cortos. Sin embargo, un incremento adicional (como en el caso de *Alcalase*®, evaluada a tres temperaturas) provocó una disminución del grado de hidrólisis alcanzado o requirió un mayor tiempo para obtener valores similares a los obtenidos en temperaturas más bajas. Por ejemplo, el incremento de la temperatura de 55 a 60°C provocó una disminución en el grado de hidrólisis de 15,16 a 6,40% al utilizar 5 g de *Alcalase*®, con tiempos de reacción similares (85 y 70 min, respectivamente); mientras que, con 10 g de la misma enzima inmovilizada, dicho aumento de temperatura implicó una prolongación del tiempo necesario de 70 a 120 min para alcanzar grados de hidrólisis similares (14,80 y 15,03%).

En función de los resultados obtenidos, las condiciones seleccionadas para el escalado del WPH-A fueron 55°C y 15 g de derivado de *Alcalase*® por cada 60 ml de solución de WPC8% (6,5% [m/m]), donde se alcanzó el grado de hidrólisis estipulado en 60 min, tiempo similar al reportado por Eberhardt et al. (2025) y menor que el requerido a otras temperaturas evaluadas con esa misma masa de derivado enzimático (80 y 85 min). En el caso del WPH-AF, se seleccionaron como condiciones de escalado 50°C y 8 g de derivado de *Flavourzyme*® por cada 60 ml del WPH-A (34,4% [m/m]), donde se logró un grado de hidrólisis cercano al estipulado en un tiempo similar al informado por los mismos autores (120 min). Estas condiciones indicaron que, aunque el rendimiento teórico de inmovilización en términos de proteína evidenció valores muy interesantes, la actividad de las enzimas resultó comprometida luego del proceso de

inmovilización, lo que requirió una masa de derivado 3 o 4 veces superior a la calculada inicialmente para alcanzar los DH estipulados (Bolívar et al., 2022; Robescu & Bavaro, 2025).

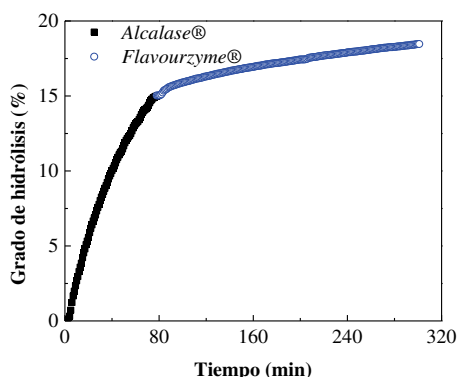
**Tabla 28.** Grado de hidrólisis alcanzado y tiempo de reacción requerido en las pruebas preliminares.

Enzima	Masa de derivado (g)	Temperatura (°C)	Grado de hidrólisis (%)	Tiempo de reacción (min)
<i>Alcalase</i> ®	5	50	6,71	70
		55	15,16	85
		60	6,40	70
	10	50	15,29	180
		55	14,80	70
		60	15,03	120
	15	50	11,00	80
		55	15,56	60
		60	14,92	85
<i>Flavourzyme</i> ®	2	45	2,01	120
		50	2,82	120
	5	45	2,55	120
		50	3,24	120
	8	45	3,22	120
		50	4,29	120

#### 4.5.1.2. Obtención cuantitativa de hidrolizados

Una vez definidas las condiciones de reacción, se llevó a cabo la hidrólisis de la solución de WPC8% utilizando los derivados inmovilizados y a una mayor escala de trabajo (el volumen inicial de muestra a hidrolizar fue 1,5 L). La **Figura 57** muestra la evolución del grado de hidrólisis en función del tiempo de reacción, tanto para la hidrólisis realizada exclusivamente con *Alcalase*® inmovilizada como para la hidrólisis secuencial, continuada con *Flavourzyme*® inmovilizada. Se observa un aumento gradual del grado de hidrólisis en la obtención del WPH-A, alcanzándose el valor deseado (15,03%) a un tiempo algo superior (78 min) al reportado por Eberhardt et al. (2025). Mientras que, en la obtención del WPH-AF, el comportamiento resultó algo más lento que el evidenciado en la prueba preliminar (4,29% de DH en 120 min), ya que dicha hidrólisis requirió de 223 min para alcanzar un DH del 3,43%. Esto podría deberse a una

posible pérdida de actividad del derivado enzimático, considerando el tiempo transcurrido entre su síntesis y el momento en que se llevó a cabo la hidrólisis.



**Figura 57.** Hidrólisis cuantitativa simple (*Alcalase*®) y secuencial (*Alcalase*® y *Flavourzyme*®) del concentrado de proteína de suero lácteo, trabajando a una mayor escala.

Otros autores han reportado resultados consistentes con lo observado en este estudio, mostrando mayores grados de hidrólisis o una eficiencia de hidrólisis proteica superior al emplear las enzimas en su forma libre, en comparación con su forma inmovilizada bajo las mismas condiciones (Alpay & Uygun, 2015; Fenoglio et al., 2016; Pessato et al., 2016; Rocha et al., 2017), habiendo atribuido estas diferencias a las limitaciones difusionales del sustrato (Rocha et al., 2017).

Los resultados obtenidos (sumado a lo reportado en la bibliografía) sugieren que, si bien la inmovilización enzimática puede ofrecer ventajas operativas como lo son la reutilización del biocatalizador y/o una mayor estabilidad, no garantiza necesariamente mejoras en el proceso hidrolítico, y su impacto claramente puede depender del tipo de enzima, de las condiciones del sistema y de la naturaleza del sustrato.

#### **4.5.2. Caracterización de los hidrolizados**

Una vez obtenidos los hidrolizados mediante las reacciones de hidrólisis a mayor escala empleando los biocatalizadores sintetizados, su posterior caracterización permitió: **a)** evaluar propiedades fisicoquímicas, tecnofuncionales y biológicas; y **b)** analizar el efecto que podría tener el tratamiento térmico de inactivación enzimática y el método de secado aplicado sobre la calidad integral de los ingredientes obtenidos.

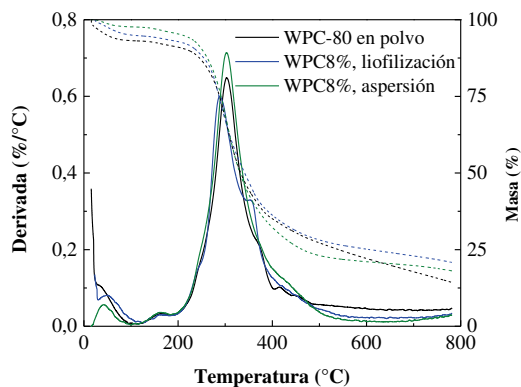
##### **4.5.2.1. Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis termogravimétrico es una técnica cuantitativa que permite monitorear el comportamiento de una muestra en función de la temperatura, mientras ésta se calienta en un

horno bajo condiciones controladas. Permite observar fenómenos como la pérdida de compuestos volátiles, la descomposición térmica de materiales, y la estabilidad térmica de los mismos (Saadatkah et al., 2020). El termograma resultante suele dividirse en varias etapas térmicas características: **a)**- por debajo de 150°C, se libera principalmente agua fisisorbida, además de compuestos volátiles de bajo peso molecular, solventes y gases atrapados; **b)**- entre 150 y 250°C, la pérdida de masa se debe a la liberación de agua quimisorbida y de compuestos ligeros, como aditivos o productos de descomposición volátiles; **c)**- por encima de 250°C, los compuestos comienzan a descomponerse térmicamente, y el material residual por encima de la temperatura final suele estar compuesto por cenizas inorgánicas no volátiles y metales. Además, el análisis de la derivada de la curva de pérdida de masa permite identificar los puntos de inflexión, que ayudan a distinguir eventos térmicos que podrían superponerse en mezclas multicomponente (Saadatkah et al., 2020).

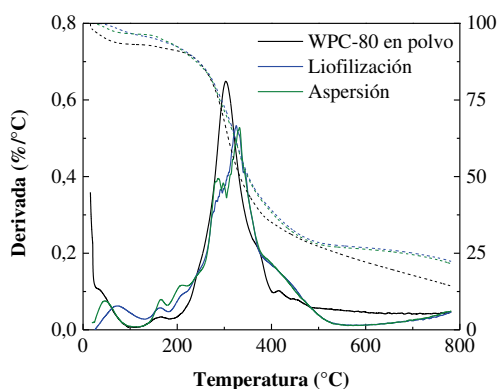
En este sentido, en las **Figuras 58 y 59** se presentan las curvas obtenidas a partir del análisis termogravimétrico de las distintas muestras analizadas. En términos generales, no se observan diferencias significativas entre las distintas muestras control (WPC-80 en polvo, WPC8% liofilizado y WPC8% secado por aspersión) tanto en la curva de pérdida de masa como en su derivada (**Figura 58**). Las curvas de derivada de los controles muestran un único pico definido por encima de los 250°C, lo que concuerda con lo reportado por Saadatkah et al. (2020), quienes lo atribuyen a la degradación térmica de las proteínas. El máximo de dicho pico se localiza en torno a los 300°C, con una pérdida de masa del 25-35%, es decir, con un 65-75% de masa remanente. Sin embargo, es importante destacar que, en el caso de la muestra liofilizada, la temperatura de desnaturalización es menor (aproximadamente 289°C). Esto podría atribuirse a que las proteínas en este caso están mejor organizadas estructuralmente debido a la baja cantidad de agua remanente, lo que las hace más sensibles al calor, en comparación con las proteínas en la muestra secada por aspersión (aproximadamente 303°C), que contienen mayor contenido de agua, están menos organizadas y, por ende, su transición ocurre a mayor temperatura.

En el caso de los hidrolizados (WPH-A y WPH-AF), se observan modificaciones en la forma y posición del pico principal (**Figura 59**). La señal de derivada correspondiente al WPC-80 se desplazó hacia la derecha (mayores temperaturas) y perdió definición, dividiéndose en múltiples eventos térmicos.

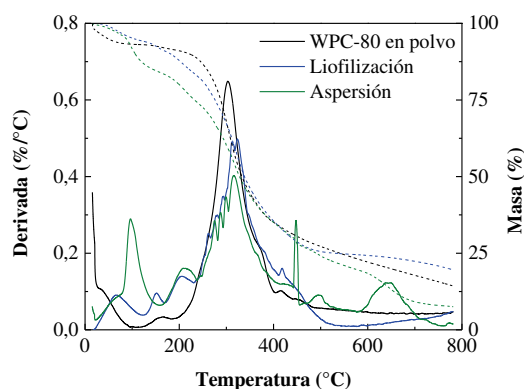


**Figura 58.** Análisis termogravimétrico y derivada termogravimétrica de las muestras control. Línea continua: derivada. Línea discontinua: masa.

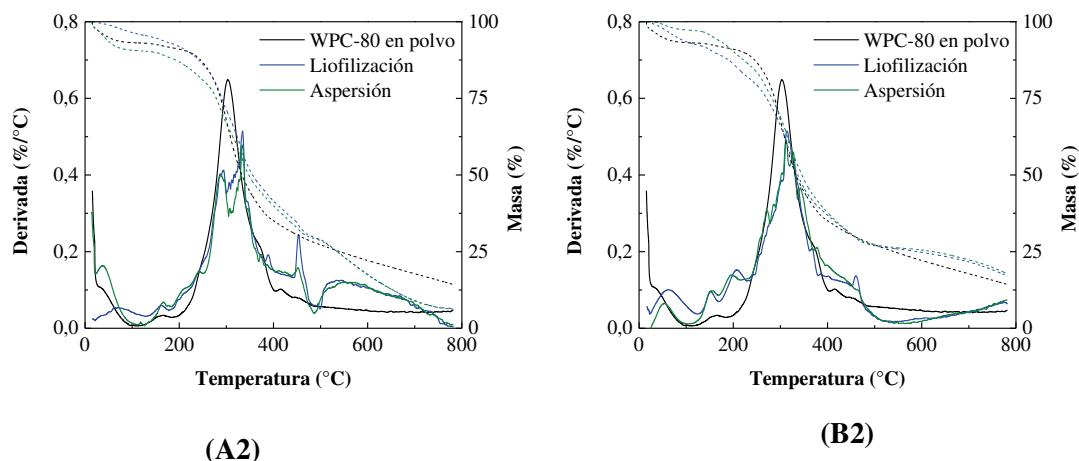
En particular, aparecen picos secundarios por debajo de los 250°C, que, según Saadatkhan et al. (2020), podrían asociarse a la evaporación de agua y la liberación de compuestos volátiles de bajo peso molecular. Por encima de los 250°C, el pico único del control se fragmentó en varios eventos en los hidrolizados, con máximos que se ubicaron entre 315 y 334°C. Este desplazamiento hacia temperaturas más altas sugiere un incremento en la estabilidad térmica, posiblemente relacionado con la formación de estructuras de menor peso molecular o con interacciones nuevas entre péptidos. Sin embargo, este comportamiento no se observó al comparar las temperaturas de desnaturalización entre los hidrolizados: el aumento del grado de hidrólisis condujo a una reducción de esta temperatura (**Tabla 29**). La curva de derivada del WPH-A presenta claramente dos picos diferenciados, mientras que WPH-AF mantiene un perfil más cercano al observado en el control. Al comparar los métodos de secado (liofilización versus secado por aspersion), no se identifican diferencias marcadas en los perfiles obtenidos. Del mismo modo, el tratamiento térmico aplicado no parece haber modificado sustancialmente el comportamiento térmico general.



(A1)



(B1)



**Figura 59.** Análisis termogravimétrico y derivada termogravimétrica de las muestras de hidrolizado. (A) WPH-A. (B) WPH-AF. (1) sin tratar térmicamente. (2) tratado térmicamente. Línea continua: derivada. Línea discontinua: masa.

**Tabla 29.** Temperaturas de desnaturalización observadas (máximos de las curvas de derivada) de las muestras de hidrolizados, obtenidas a partir del análisis termogravimétrico.

Hidrolizado	Tratamiento térmico	Técnica de secado	Temperatura (°C)
WPH-A	No	Liofilización	329±5
		Aspersión	330±2
	Si	Liofilización	333±2
		Aspersión	334±0
WPH-AF	No	Liofilización	317±8
		Aspersión	315±1
	Si	Liofilización	315±1
		Aspersión	315±4
<b>Factor A: Tipo de hidrolizado</b>			*
<b>Factor B: Tratamiento térmico</b>			NS
<b>Factor C: Técnica de secado</b>			NS
<b>Interacción AB</b>			NS
<b>Interacción AC</b>			NS
<b>Interacción BC</b>			NS
<b>Interacción ABC</b>			NS

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Controles: WPC-80 en polvo =  $305 \pm 3^\circ\text{C}^b$ ; WPC8% liofilizado =  $289 \pm 0^\circ\text{C}^a$ ; WPC8% secado por aspersión =  $303 \pm 0^\circ\text{C}^b$ . Letras diferentes en los controles indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la bibliografía se ha reportado que el tratamiento con microondas, ultrasonido y el tratamiento combinado de estos sobre una proteína miofibrilar llevó a un incremento de la temperatura de degradación, asociado a la reducción en el contenido de estructuras ordenadas (Li et al., 2020), lo cual se puede asociar al efecto de la hidrólisis evidenciado anteriormente sobre el WPC-80. En una investigación más relacionada con el presente trabajo, la hidrólisis de aislado de proteína de suero mediante cavitación hidrodinámica, a diferencia de lo obtenido, redujo la estabilidad térmica, lo que se asoció con la generación de estructuras moleculares más pequeñas y menos compactas, que son susceptibles a descomposición térmica a temperaturas más bajas (Muley et al., 2021).

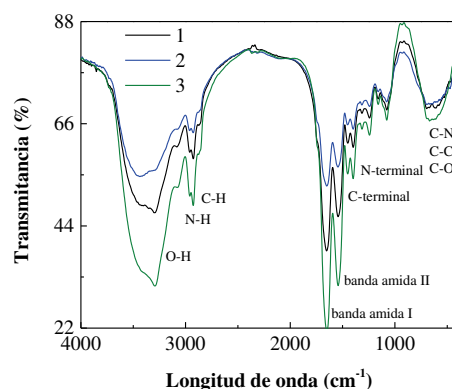
En líneas generales, los resultados del análisis termogravimétrico sugieren que la hidrólisis enzimática del concentrado de proteínas de suero permitió incrementar su estabilidad térmica, evidenciada por el desplazamiento de los eventos de degradación hacia temperaturas más altas y la aparición de múltiples etapas térmicas diferenciadas. Este comportamiento podría estar asociado a la formación de nuevas interacciones intermoleculares entre péptidos de bajo peso molecular generados durante la hidrólisis. Esta mayor estabilidad térmica, junto con otras mejoras funcionales observadas tras la hidrólisis (como el aumento de la humectabilidad, solubilidad y actividad antioxidante), refuerza el potencial de los hidrolizados como ingredientes funcionales más resistentes a tratamientos térmicos, lo cual resulta especialmente beneficioso para aplicaciones industriales que involucran procesos de calentamiento.

#### 4.5.2.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) es un método espectroscópico que permite caracterizar hidrolizados (Mâge et al., 2021). Se basa en la absorción de radiación infrarroja provocada por las vibraciones moleculares, que proporciona información detallada sobre la composición química y la estructura conformacional del producto evaluado (Van Der Ven et al., 2002).

En este contexto, se aplicó la espectroscopía FT-IR para caracterizar las muestras control (**Figura 60**) y de hidrolizados (**Figura 61**), utilizando un rango de longitud de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Se observó una forma de curva similar en las tres muestras control: WPC-80 en polvo, WPC8% liofilizado y WPC8% secado por aspersión (**Figura 60**). En varias regiones del espectro, la muestra control preparada al 8% y liofilizada presentó valores de transmitancia superiores (poca

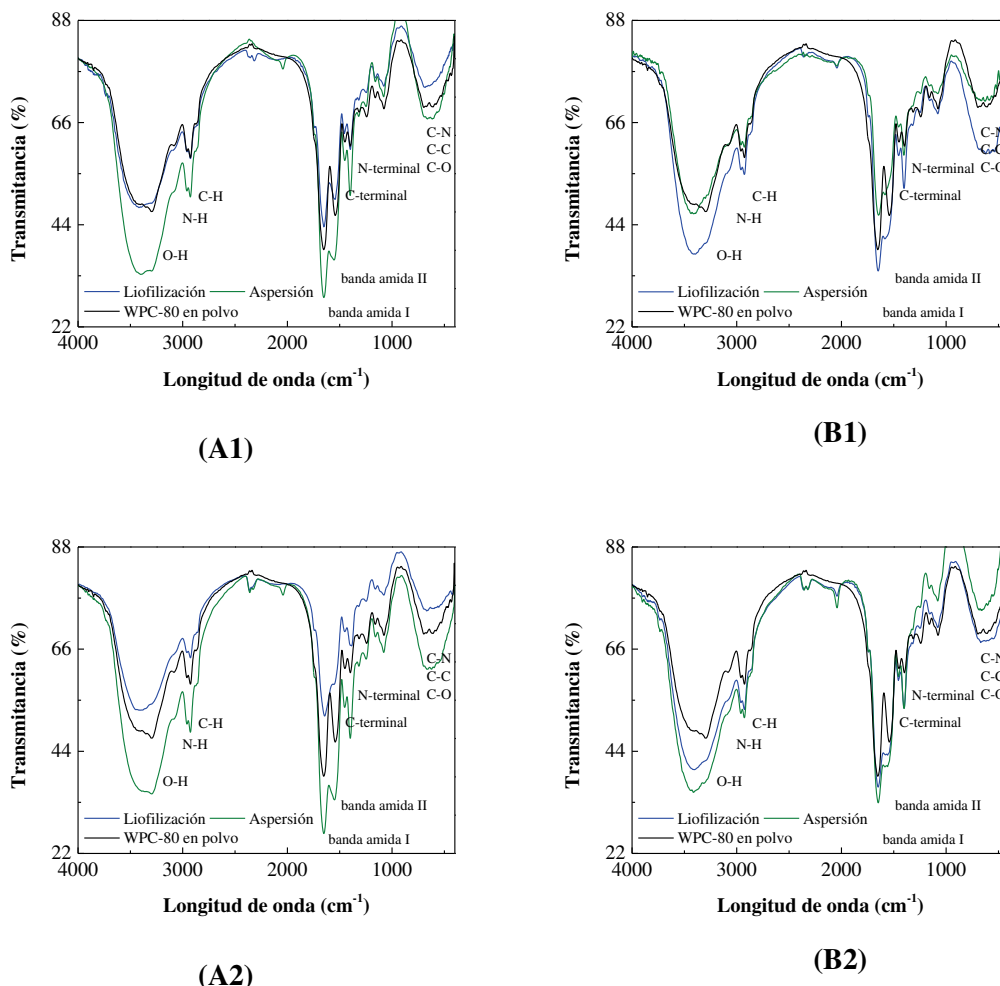
absorción de luz) a los del WPC-80 en polvo, mientras que la muestra al 8% secada por aspersión mostró valores inferiores (alta absorción de luz). Es posible indicar que se identificaron las bandas características de los grupos funcionales presentes en las proteínas: las bandas amida I (~1700-1600  $\text{cm}^{-1}$ ), amida II (~1590-1520  $\text{cm}^{-1}$ ), y las correspondientes a las regiones N-terminal (~1510  $\text{cm}^{-1}$ ) y C-terminal (~1400  $\text{cm}^{-1}$ ), de acuerdo con lo reportado por Yathisha et al. (2022). La vibración amida I se asocia al estiramiento de los grupos carbonilo (C=O), mientras que la vibración amida II a la deformación (o flexión) de los enlaces N-H y al estiramiento de los enlaces C-N (Van Der Ven et al., 2002). A su vez, las bandas amida I y II, junto con las vibraciones de los grupos N-terminal y C-terminal, son características diagnósticas en los espectros de infrarrojo y se han relacionado con la descomposición de proteínas durante la hidrólisis enzimática (Kristoffersen et al., 2020). Además, se observaron vibraciones de estiramiento correspondientes a los grupos N-H, C-H y O-H por encima de 2500  $\text{cm}^{-1}$ , y señales relacionadas con enlaces C-N, C-C y C-O por debajo de 1500  $\text{cm}^{-1}$  (Yathisha et al., 2022). Es importante tener presente que la frecuencia exacta de estos enlaces varía dependiendo de la estructura secundaria de las proteínas o los péptidos (Van Der Ven et al., 2002).



**Figura 60.** Análisis FT-IR de las muestras control. 1: WPC-80 en polvo. 2: WPC8% liofilizado. 3: WPC8% secado por aspersión. Las asignaciones de bandas fueron tomadas de Yathisha et al. (2022).

En toda proteína intacta, el grupo carbonilo está expuesto a la donación electrónica del átomo de nitrógeno. Sin embargo, tras la hidrólisis, el grupo carbonilo C-terminal pierde esta exposición, lo que teóricamente provoca un desplazamiento en la frecuencia de vibración del estiramiento del carbonilo, moviéndose de aproximadamente 1640 a 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Además, durante la hidrólisis, se espera que la banda amida II (alrededor de 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) disminuya debido a la ruptura del enlace C-N. Al mismo tiempo, la flexión N-H de las amidas primarias, alrededor de 1600  $\text{cm}^{-1}$ , aumentará en intensidad conforme avance la hidrólisis. En proteínas intactas, además de los grupos terminales N- y C-, los únicos residuos con grupos amino y carboxilo libres son los de las cadenas laterales de los residuos Asp, Glu y Lys. Sin embargo, a medida que avanza la

hidrólisis, se incrementa la cantidad de residuos libres de amino y carboxilo, lo que, junto con los cambios en la estructura secundaria de la proteína, debería dar lugar a modificaciones en el espectro infrarrojo (Poulsen et al., 2016).



**Figura 61.** Análisis FT-IR de las muestras de hidrolizados. (A) WPH-A. (B) WPH-AF. (1) Sin tratar térmicamente. (2) Tratada térmicamente.

En cuanto a los hidrolizados, aunque ambos mostraron un comportamiento similar con el WPC-80 en polvo, se identificaron algunas diferencias. Por ejemplo, las muestras de WPH-A secadas por aspersión y las de WPH-AF liofilizadas presentaron mayor intensidad en algunos picos, mientras que el WPH-A tratado térmicamente y liofilizado mostró picos por encima del espectro del WPC-80. Estas diferencias en la intensidad y forma de los picos pueden atribuirse a la hidrólisis que afecta la estructura secundaria y exposición de grupos funcionales. El aumento de la intensidad de los picos observado coincide con lo reportado por Yathisha et al. (2022), quienes, al hidrolizar proteínas de pescado durante 5 h, observaron picos más predominantes a tiempos de hidrólisis de 3 a 5 h, específicamente en regiones de 1000-1700 cm<sup>-1</sup>, aquellas

correspondientes a las bandas de amida II (1500-1600  $\text{cm}^{-1}$ ) y a la región de 2500-3000  $\text{cm}^{-1}$ , relacionadas a la vibración de estiramiento de N-H y C-H.

En la bibliografía se han reportado cambios similares a los observados en este trabajo, como alteraciones en las bandas asociadas con los enlaces de hidrógeno, esenciales para la estabilidad de la estructura secundaria (Poulsen et al., 2016; Pang et al., 2024), así como variaciones en las bandas amida I y II, que indican modificaciones en la estructura secundaria de las proteínas durante la hidrólisis (Poulsen et al., 2016; Wubshet et al., 2017; Pang et al., 2024). Además, se ha informado un cambio en el contenido de estructuras secundarias, como un incremento en la proporción de  $\alpha$ -hélice y una reducción de las láminas  $\beta$ , lo cual es indicativo de la degradación de las principales proteínas del concentrado de suero lácteo, como  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina (Chang et al., 2023).

Al analizar el efecto del método de secado, se observó que este influyó en la intensidad de las bandas en los espectros FT-IR de los hidrolizados. En el caso del WPH-A, las muestras secadas por aspersión presentaron picos más pronunciados (alta absorción de luz, menor transmitancia) en comparación con el WPC-80 en polvo, lo que podría indicar una mayor concentración o exposición de grupos funcionales como resultado del tratamiento térmico durante el secado. En cambio, las muestras liofilizadas del WPH-A mostraron una menor intensidad de picos cuando fueron tratadas térmicamente, o bien una respuesta espectral similar al control cuando no fueron tratadas térmicamente. Para el WPH-AF se observó un comportamiento opuesto al del WPH-A. Las muestras liofilizadas, tanto tratadas como no tratadas térmicamente, presentaron picos más intensos que el WPC-80 en polvo, mientras que las muestras secadas por aspersión y sin tratamiento térmico mostraron un espectro similar al del control. No obstante, la muestra de WPH-AF tratada térmicamente y secada por aspersión presentó un comportamiento similar al de las muestras liofilizadas, lo que sugiere que, en este caso, el tratamiento térmico tuvo un efecto predominante sobre la intensidad espectral, independientemente del método de secado. En la bibliografía se ha reportado una mayor intensidad en la banda amida III en el hidrolizado de proteínas de la piel de pescado secado por aspersión, en comparación con el liofilizado, lo cual se asoció a interacciones intermoleculares más fuertes entre los péptidos de este hidrolizado, probablemente debido a las altas temperaturas alcanzadas durante el secado por aspersión (Dong et al., 2022). Este comportamiento también se observó en la presente tesis, reflejado en el aumento de la intensidad de absorbancia en las muestras de WPH-A secadas por aspersión.

El tratamiento térmico tuvo efectos variables según el tipo de muestra. En el caso del WPH-A liofilizado, su aplicación redujo la intensidad de los picos (por encima del WPC-80 en polvo), lo que está relacionado con una mayor desnaturalización proteica o la ruptura de enlaces secundarios. En ausencia de tratamiento térmico, esta muestra mostró un espectro similar al del

control. En cambio, en muestras como el WPH-A secado por aspersión y el WPH-AF liofilizado, se observó un aumento en la intensidad de los picos (por debajo del WPC-80 en polvo), tanto con las muestras sin como con tratamiento térmico. De forma similar, en el WPH-AF secado por aspersión, dicho incremento se evidenció únicamente cuando se aplicó calor, lo que sugiere posibles procesos de agregación o cambios estructurales inducidos térmicamente. Por último, algunas condiciones no mostraron variaciones notables respecto al control, como fue el caso del WPH-A sin tratamiento térmico y liofilizado y del WPH-AF sin tratamiento térmico y secado por aspersión. Hussain et al. (2012) también observaron distintos efectos del tratamiento térmico sobre aislados de proteína de suero.

La estructura secundaria de las proteínas influye directamente en su reactividad química, las interacciones intermoleculares y sus propiedades funcionales (Chang et al., 2023). Por lo tanto, los cambios observados en el análisis FT-IR permiten explicar ciertos fenómenos observados en los hidrolizados que contribuyen a las mejoras en las propiedades funcionales del WPC-80 tras su hidrólisis enzimática.

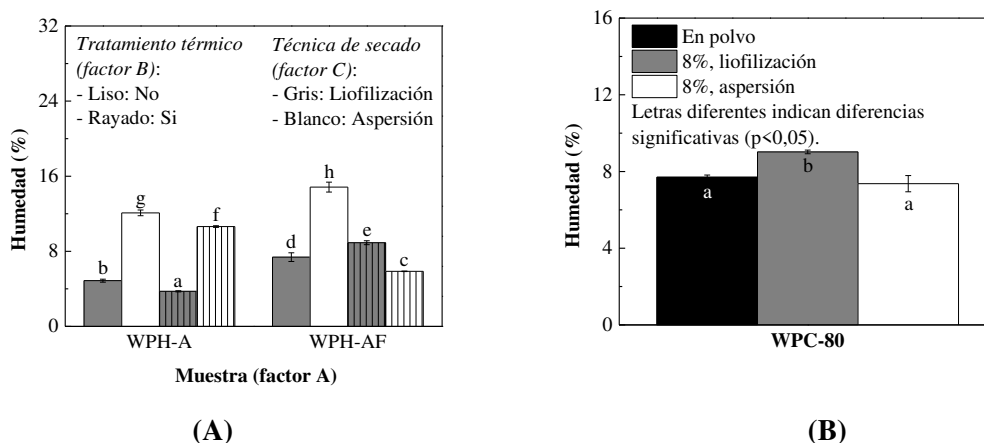
#### 4.5.2.3. Humedad

La humedad es un aspecto clave en los productos en polvo, ya que influye tanto en su almacenamiento como en su uso. Un contenido de humedad elevado puede provocar aglomeración, obstrucciones en los equipos y proliferación microbiana, así como también un incremento en los costos de transporte debido al mayor peso. Por el contrario, un contenido de humedad demasiado bajo puede generar exceso de polvo, mala adherencia e inconsistencias en la textura del producto (Hammond, 2025). Por ello, se consideró relevante evaluar el contenido de humedad de las muestras obtenidas, cuyos resultados se presentan en la **Figura 62**.

La hidrólisis del WPC-80 ocasionó distintos efectos en el contenido de humedad, comportamiento que difirió de lo observado por Eberhardt (2025), quien reportó que los hidrolizados obtenidos con enzimas en estado libre (y secados por liofilización) presentaron un menor contenido de humedad (~5%) en comparación con el WPC-80 (~7%). En el presente trabajo, algunas muestras de hidrolizado presentaron un contenido de humedad inferior al del WPC-80 en polvo ( $7,70 \pm 0,11\%$ ), como fue el caso del WPH-A tratado y liofilizado ( $3,74 \pm 0,06\%$ ) y del WPH-AF tratado y secado por aspersión ( $5,87 \pm 0,03\%$ ). Otras muestras mostraron valores similares, como el WPH-AF no tratado y liofilizado ( $7,38 \pm 0,47\%$ ), mientras que otras evidenciaron valores más altos, por ejemplo, el WPH-A no tratado y secado por aspersión ( $12,09 \pm 0,30\%$ ) y el WPH-AF no tratado y secado por aspersión ( $14,84 \pm 0,53\%$ ).

En cuanto a las dos muestras de hidrolizado, en general, se observó que un mayor grado de hidrólisis tendió a incrementar el contenido de humedad, con la excepción del tratamiento

térmico combinado con secado por aspersion, donde se registró una reducción (de 10,63 a 5,87%). Estos resultados difieren de lo observado al utilizar las enzimas en estado libre (Eberhardt, 2025), donde tanto el hidrolizado obtenido únicamente con *Alcalase*® (5,57±0,40%) como el generado mediante hidrolisis secuencial con *Alcalase*® y *Flavourzyme*® (5,57±0,02) presentaron contenidos de humedad estadísticamente similares. Por su parte, el tratamiento térmico provocó una disminución del contenido de humedad en el WPH-A, efecto que también se observó en el WPH-AF secado por aspersion. Sin embargo, en las muestras de WPH-AF secadas por liofilización, el tratamiento térmico resultó en un aumento del contenido de humedad. En cuanto al método de secado, se observó que, en la mayoría de los casos, las muestras secadas por aspersion presentaron un mayor contenido de humedad que las liofilizadas, con la excepción del WPH-AF tratado térmicamente, donde se evidenció lo contrario. A diferencia de este comportamiento, en las muestras de WPC8%, el secado por aspersion no modificó significativamente el contenido de humedad respecto al producto en polvo original, mientras que la liofilización generó un aumento.



**Figura 62.** Contenido de humedad de las muestras de hidrolizados (A) y de los controles (B) en polvo.

Resultados del ANOVA de múltiples vías, correspondientes a la figura (A): -factores A, B y C e interacciones AB, AC, BC y ABC: \*, -\*: efecto significativo; -letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Al analizar las ocho muestras de hidrolizados, se observa que aquellas con menor contenido de humedad corresponden principalmente a las secadas por liofilización, independientemente del tipo de hidrolizado (WPH-A o WPH-AF) o la aplicación de tratamiento térmico, factores que se distribuyen equitativamente entre ambos grupos. Kleekayai et al. (2022) evaluaron el efecto del proceso de secado sobre las propiedades fisicoquímicas y biofuncionales de hidrolizados de proteína de suero obtenidos con las enzimas *Alcalase*® y *Prolzyme*®, entre ellas el contenido de humedad. Al igual que en la presente tesis, observaron un mayor contenido de

humedad en las muestras secadas con aspersión en comparación con las muestras liofilizadas. Los autores atribuyeron estas diferencias a los distintos principios que rigen los procesos de deshidratación y a las condiciones empleadas. En este sentido, señalaron que el mayor contenido de humedad en las muestras secadas por aspersión podría deberse al menor tamaño de partícula y, en consecuencia, a una mayor área superficial, lo que favorecería una mayor higroscopicidad. El menor contenido de humedad en las muestras liofilizadas podría otorgarles una mayor estabilidad a largo plazo en comparación con las muestras secadas por aspersión (Kleekayai et al., 2022).

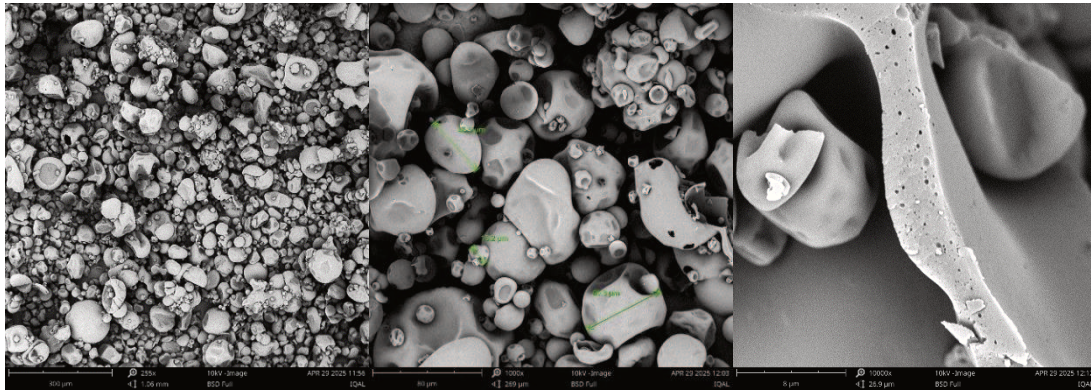
Si bien los resultados obtenidos indican que el secado por liofilización genera productos con menor contenido de humedad, lo que podría traducirse en una menor probabilidad de aglomeración, obstrucciones en la maquinaria y otras ventajas, es necesario evaluar la estabilidad de las muestras obtenidas mediante ambos métodos (liofilización y secado por aspersión). Esto permitirá determinar si existen diferencias significativas en el comportamiento del producto a lo largo del tiempo y, en última instancia, si la liofilización resulta realmente conveniente como método de secado, considerando que su costo es considerablemente más alto. Por ello, es fundamental analizar la relación costo-beneficio antes de tomar una decisión.

#### *4.5.2.4. Microscopía electrónica de barrido*

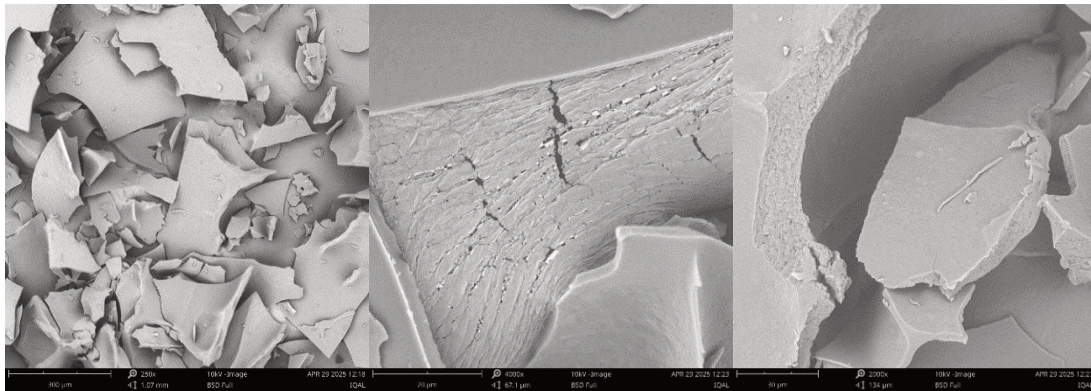
La microscopía electrónica de barrido es una técnica avanzada que permite observar directamente la superficie de los materiales, brindando información detallada sobre su morfología microestructural. Esta herramienta es ampliamente utilizada debido a su alta resolución y profundidad de campo, lo que la hace especialmente útil para caracterizar compuestos sólidos a nivel microscópico (Zhou et al., 2007; Hidayanti & Harnova, 2020).

En este estudio, se emplearon las imágenes obtenidas mediante esta técnica para analizar la morfología de las muestras, las cuales se presentan en las **Figuras 63 a 65**. Se evidencian diferencias morfológicas notables entre las muestras secadas por liofilización y aquellas sometidas a secado por aspersión. En las muestras liofilizadas se observan estructuras irregulares y fragmentadas, las cuales son características del secado por sublimación. Por el contrario, en las muestras secadas por aspersión se identifican partículas de morfología predominantemente esférica, con superficies arrugadas o parcialmente colapsadas, lo cual es típico del proceso de secado por aspersión, en el que se generan pequeñas gotas durante la atomización. Estos resultados coinciden con lo reportado por Kleekayai et al. (2022), quienes evaluaron el efecto del tipo de secado sobre hidrolizados de proteína de suero obtenidos con las enzimas *Alcalase*® y *Prollyve*®. Los autores observaron diferencias similares en la microestructura según el método utilizado e indicaron que estudios previos sobre hidrolizados proteicos de suero y clara de huevo

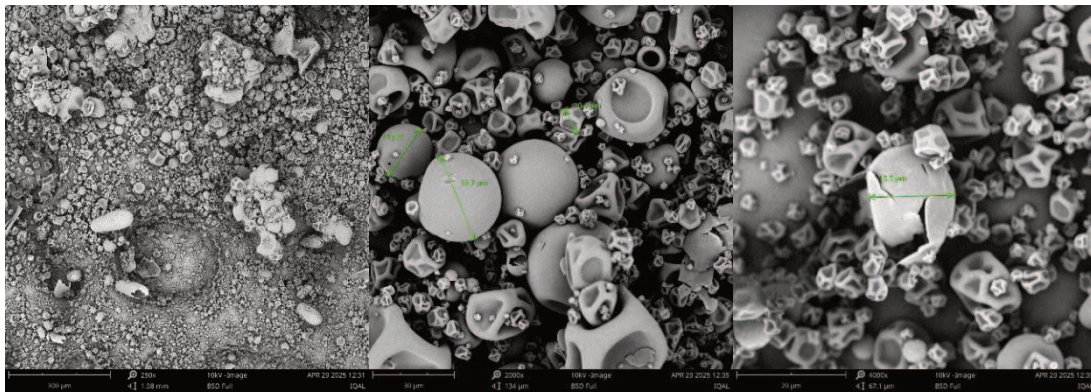
también han reportado partículas fragmentadas en muestras liofilizadas y estructuras esféricas en aquellas secadas por aspersión (Kleekayai et al., 2022).



(A)



(B)

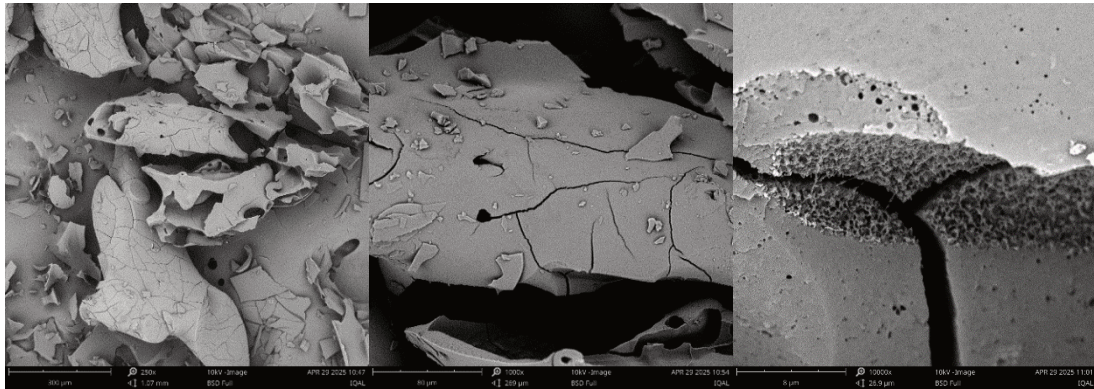


(C)

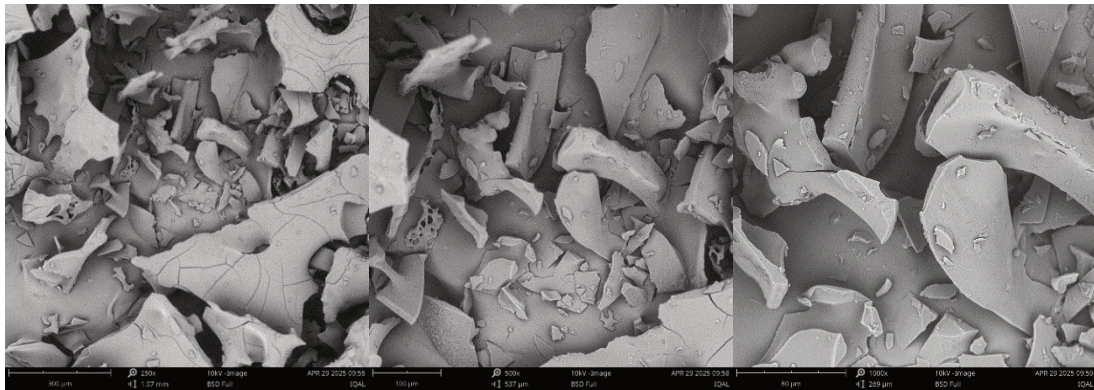
**Figura 63.** Microscopía electrónica de barrido de las muestras control. (A) WPC-80 en polvo. (B) WPC8% liofilizado. (C) WPC8% secado por aspersión.

En particular, en ambas muestras liofilizadas de hidrolizados (**Figura 64**) se aprecian grietas en la superficie. Sin embargo, en el WPH-AF se identifican zonas con estructuras lamelares. No se observaron diferencias morfológicas destacables entre las muestras tratadas y no tratadas térmicamente. En comparación con la muestra control de WPC8% liofilizado (**Figura 63.B**), los hidrolizados presentan una mayor cantidad de fracturas y superficies más irregulares y

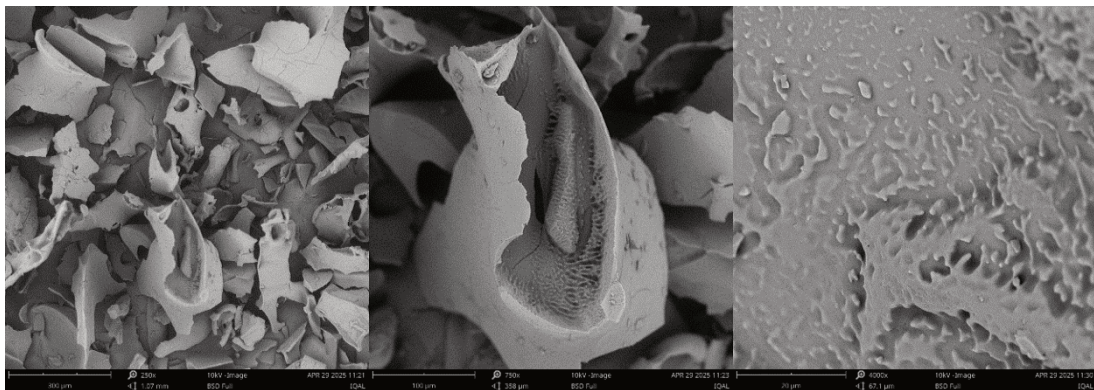
agrietadas, mientras que el control muestra placas más uniformes, con bordes más definidos y con escasa presencia de grietas, lo que sugiere una mayor integridad estructural. Además, en comparación con el control en polvo sin liofilizar, se observa la pérdida de la estructura esférica como consecuencia tanto de la hidrólisis como de la liofilización, tal como lo observaron Shuai et al. (2022) al evaluar el efecto de la hidrólisis de distintas enzimas (*Flavourzyme*, *Neutrase*, *Alcalase* y *Tripsina*) sobre la morfología de la proteína de guisante.



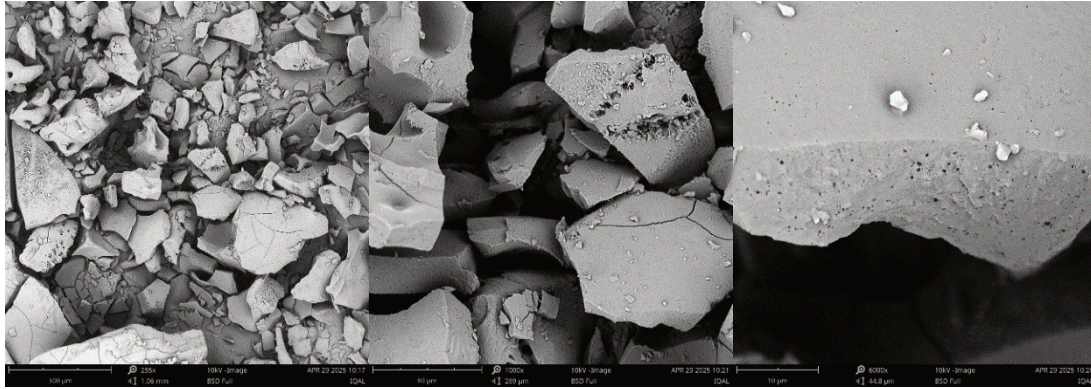
(A1)



(A2)



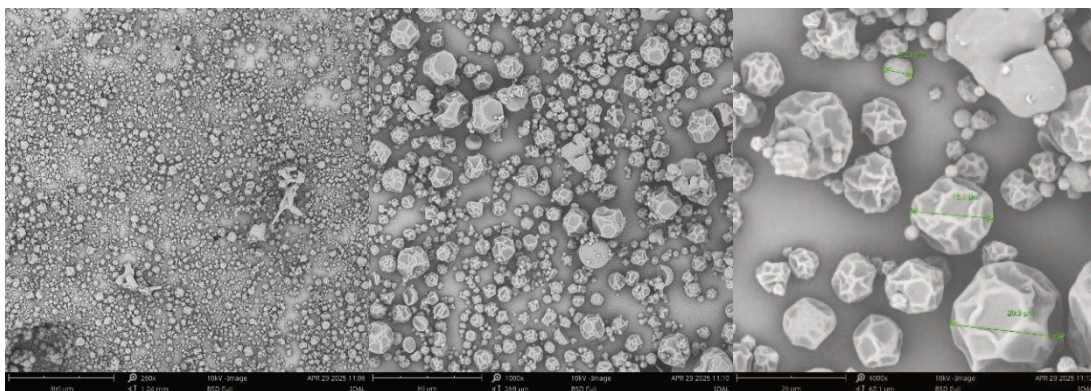
(B1)



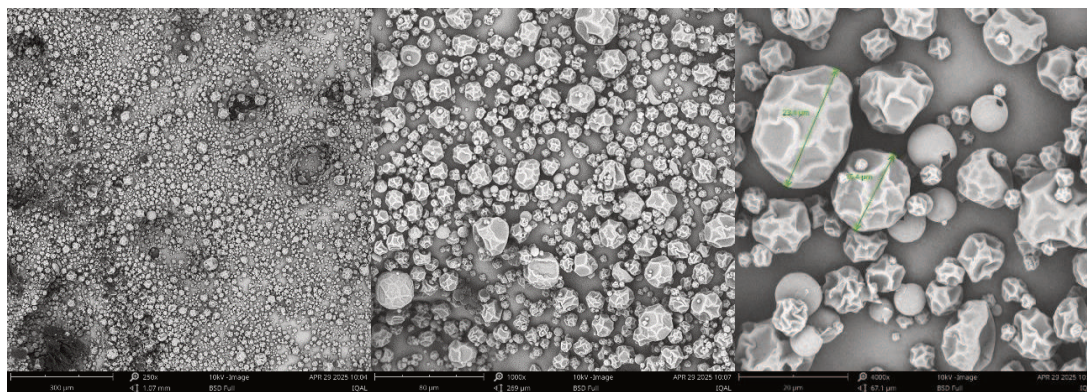
(B2)

**Figura 64.** Microscopía electrónica de barrido de las muestras de hidrolizados secadas mediante liofilización. (A) WPH-A. (B) WPH-AF. (1) Sin tratar térmicamente. (2) Tratado térmicamente.

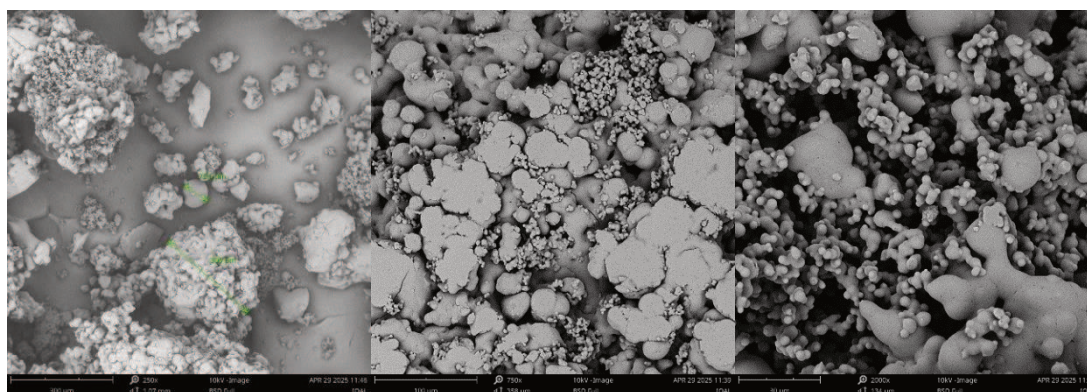
En el caso de las muestras secadas por aspersión (**Figura 65**), se observa una distribución de tamaño heterogénea, con partículas de distintos diámetros coexistiendo en una misma muestra. Al igual que en las muestras liofilizadas, no se encontraron diferencias morfológicas evidentes entre las variantes tratadas y no tratadas térmicamente, ni entre los distintos hidrolizados obtenidos. Sin embargo, al comparar con el control WPC8% secado por aspersión, se aprecia que este último presenta partículas más lisas y con menor colapso superficial. Por otro lado, en comparación con el control en polvo sin atomizar, se advierte una similitud morfológica, ya que en las muestras de hidrolizados secadas por aspersión se recupera parcialmente la estructura esférica original que, como se evidenció en los hidrolizados liofilizados, se pierde durante el secado por sublimación. Esto sugiere que el secado por aspersión permitiría preservar en mayor medida la morfología globular propia de la proteína en polvo nativa.



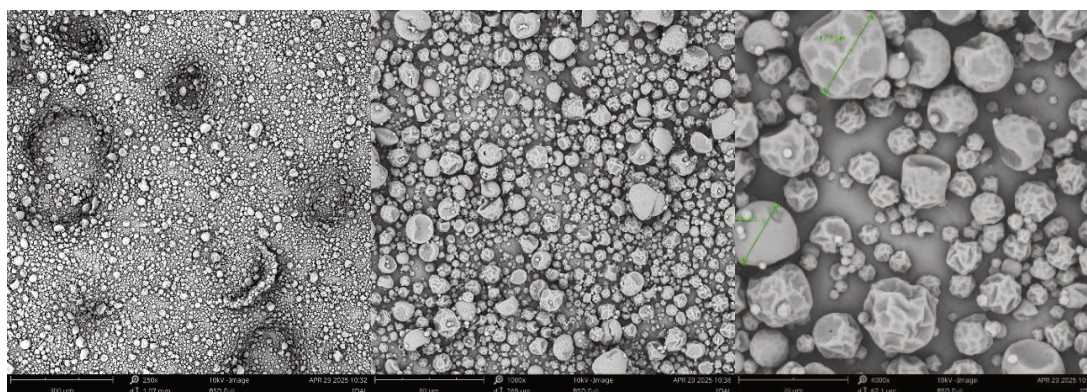
(A1)



(A2)



(B1)

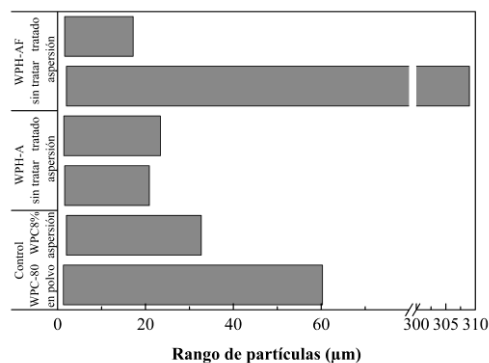


(B2)

**Figura 65.** Microscopía electrónica de barrido de las muestras de hidrolizados secadas mediante aspersión. **(A)** WPH-A. **(B)** WPH-AF. **(1)** Sin tratar térmicamente. **(2)** Tratado térmicamente.

A partir de la información obtenida mediante SEM, se determinó el rango de tamaño de partícula para algunas muestras control y de hidrolizado. Estos valores se presentan en la **Figura 66**. Los resultados muestran que el tratamiento del WPC-80 en polvo, es decir su preparación al 8% (m/v) y posterior secado por aspersión, produjo una leve reducción en el rango de tamaño de partícula, disminuyendo el valor máximo de 60,3 a 32,7  $\mu\text{m}$ . Este comportamiento también se observó al comparar el WPC-80 en polvo con las muestras de hidrolizados, cuyo rango disminuyó a aproximadamente 20,5  $\mu\text{m}$  (valor promedio de las muestras WPH-A y WPH-AF). Sin embargo,

se identificó una excepción en la muestra WPH-AF sin tratamiento térmico, secada por aspersión, donde se observaron partículas con tamaños significativamente mayores (hasta 309  $\mu\text{m}$ ). Este comportamiento atípico podría deberse a fenómenos de apelmazamiento o aglomeración entre partículas, tal como se aprecia en la **Figura 65.B1**. En general, ni el grado de hidrólisis ni la aplicación de tratamiento térmico post-hidrólisis parecen haber tenido un efecto sustancial sobre el tamaño de las partículas, salvo en el caso mencionado anteriormente.



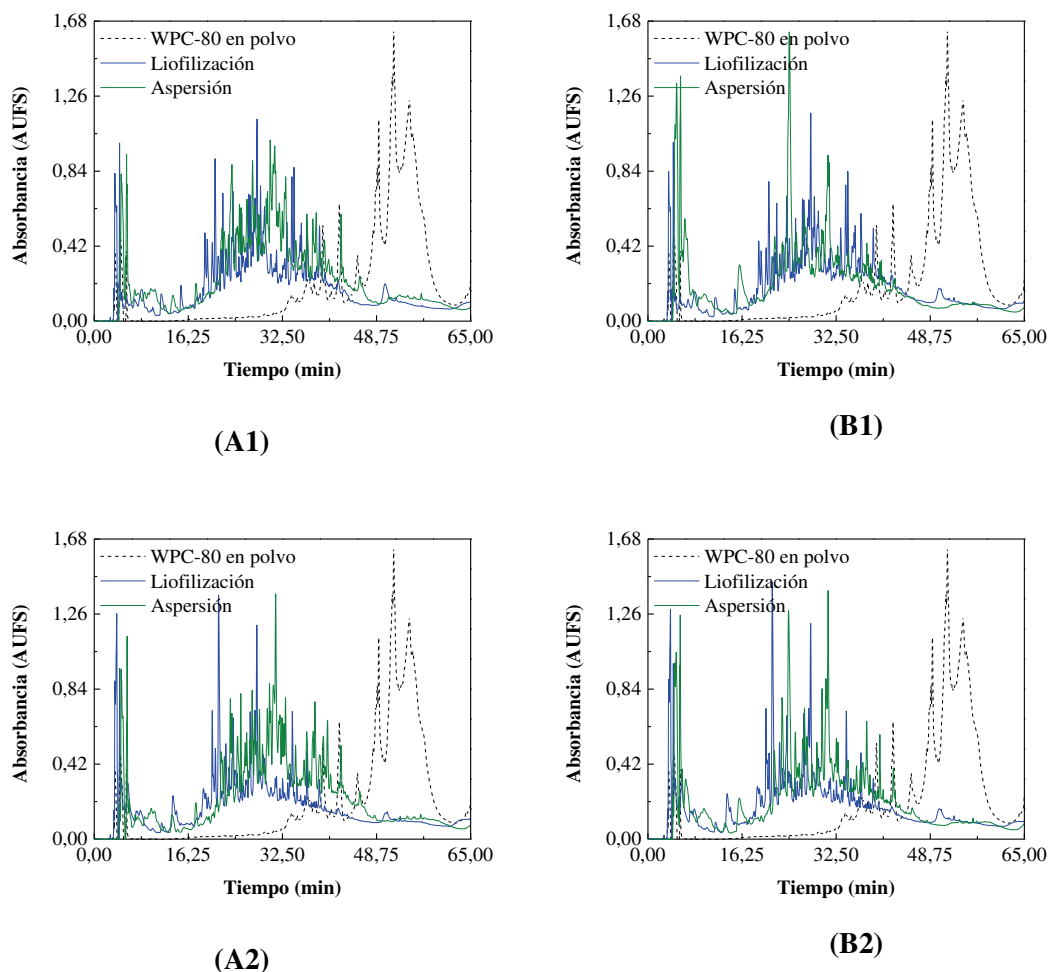
**Figura 66.** Rangos de tamaño de partícula observados por SEM en algunas muestras de hidrolizados (WPH-A y WPH-AF) y controles (WPC-80 y WPC8%).

El análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido permitió observar las estructuras características resultantes de las técnicas de secado empleadas, tanto en las muestras de hidrolizados como en las muestras control.

#### 4.5.2.5. RP-HPLC

El análisis mediante RP-HPLC permite determinar el perfil y la distribución de los péptidos presentes en las muestras. Con ese fin, los cromatogramas de cada muestra analizada se presentan en la **Figura 67**. Se observa que la hidrólisis del WPC-80 provocó la desaparición casi completa de los picos correspondientes a la albúmina sérica bovina y a la  $\beta$ -lactoglobulina, en el intervalo de tiempo de elución entre 48,75 y 65 min (Eberhardt et al., 2019). Asimismo, en las muestras de hidrolizados, se aprecia un perfil distinto y complejo, con un número interesante de picos entre los 15 y 40 min. En este sentido, el grado de hidrólisis mostró un impacto evidente sobre la distribución y cantidad de péptidos en dicho rango de tiempo (15-40 min). Este comportamiento también fue reportado por Pessato et al. (2016), quienes observaron que, al hidrolizar aislado de proteína de suero con distintos grados de hidrólisis, las condiciones de reacción condujeron a patrones de hidrólisis diferenciados, generando variaciones en los perfiles cromatográficos obtenidos. Por su parte, el tratamiento térmico y el método de secado generaron

cuantitativamente tanto incrementos como reducciones en la altura y en la presencia de distintos picos.



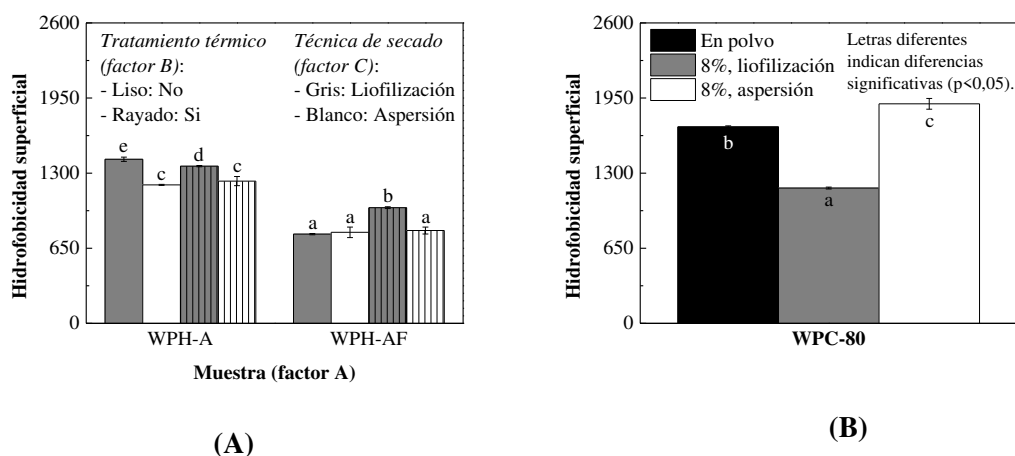
**Figura 67.** Análisis RP-HPLC de las muestras obtenidas tras la hidrólisis de WPC-80. (A) WPH-A. (B) WPH-AF. (1) Sin tratar térmicamente. (2) Tratado térmicamente.

#### 4.5.2.6. Hidrofobicidad superficial

El rol de las estructuras peptídicas en sus bioactividades y funcionalidades sigue siendo objeto de estudio, ya que ciertas características estructurales y fisicoquímicas como el tamaño molecular, la presencia o ausencia de cargas, la secuencia de aminoácidos, la hidrofobicidad y la hidrofiliidad tienen un impacto directo en sus propiedades. Comprender estos factores es crucial para el diseño de péptidos eficaces y funcionalmente útiles, así como para entender su interacción con matrices alimentarias y biológicas. La hidrofobicidad superficial de las proteínas, por ejemplo, se relaciona con una mayor capacidad para estabilizar emulsiones, actuando como emulsionantes eficaces y favoreciendo la formación de gotas de pequeño tamaño. Además, la hidrólisis proteica puede liberar péptidos con regiones hidrofóbicas expuestas, lo que potencia

aún más este efecto estabilizador. Conocer esta característica estructural, junto con otras propiedades estructurales y funcionales como la bioactividad, el sabor amargo, la agregación y el autoensamblaje, es fundamental a la hora de formular alimentos y productos farmacéuticos, ya que influye en su desempeño funcional y sensorial (Acquah et al., 2018).

En este contexto, el estudio de la hidrofobicidad superficial de los péptidos se vuelve un aspecto clave para comprender y optimizar sus aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. En la **Figura 68** se presenta la hidrofobicidad superficial de las muestras obtenidas. Es posible observar que el incremento del grado de hidrólisis del 15 (WPH-A) al 19% (WPH-AF), resultó en una reducción de la hidrofobicidad superficial. Generalmente, una mayor hidrólisis tiende a exponer más sitios hidrofóbicos, lo que incrementa la hidrofobicidad. Sin embargo, cuando el grado de hidrólisis supera un determinado valor (el cual dependerá del tipo de sustrato y de las condiciones de hidrólisis impuestas), la hidrofobicidad podría disminuir, tanto por la liberación de residuos hidrofóbicos de los péptidos como por una potencial agregación entre ellos. Este último fenómeno fue observado por Pessato et al. (2016) al hidrolizar aislado de proteína de suero con *Alcalase* libre. Estos autores informaron que, tras el uso de la versión inmovilizada de la enzima, se liberaron péptidos más grandes y, por lo tanto, más hidrofóbicos, lo que resultó en mayores valores de hidrofobicidad superficial, en comparación con los obtenidos con la enzima libre.



**Figura 68.** Hidrofobicidad superficial de las muestras de hidrolizados (A) y controles (B). Resultados del ANOVA de múltiples vías, correspondientes a la figura (A): -factores A, B y C e interacciones AB, AC, BC y ABC: \*, -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En cuanto al tratamiento térmico, no se observan cambios significativos sobre la hidrofobicidad superficial de las muestras secadas por aspersión; mientras que en las muestras

liofilizadas tuvo efectos variables. Estos resultados sugieren que la respuesta a la temperatura podría depender del tipo de hidrolizado o de las características específicas de cada muestra.

En relación con la técnica de secado, se observan distintos efectos sobre la hidrofobicidad superficial: en algunos casos, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras secadas por liofilización y las secadas por aspersión, aunque en otros, las muestras secadas por aspersión mostraron valores de hidrofobicidad superficial más bajos. Este comportamiento podría estar asociado a la naturaleza del reactivo ANSA como sonda hidrofóbica, la cual es prácticamente no fluorescente en soluciones acuosas, pero aumenta su fluorescencia al interactuar con regiones apolares en las proteínas (Cardamone & Puri, 1992). Las muestras secadas por aspersión presentaron mayor contenido de humedad residual y menor rendimiento de secado, lo que puede haber favorecido un entorno más polar, disminuyendo la interacción del ANSA con regiones hidrofóbicas expuestas y, por tanto, reduciendo la señal fluorescente observada. Además, es posible que las condiciones térmicas del secado por aspersión hayan inducido cambios conformacionales o agregación en las proteínas, ocultando regiones hidrofóbicas y afectando la capacidad del ANSA para unirse eficazmente (Liu et al., 2014). Al analizar las ocho muestras de hidrolizados, se observa que aquellas con menor hidrofobicidad superficial incluyen las muestras del WPH-AF.

Con respecto a las muestras control, se observó que la liofilización redujo la hidrofobicidad del WPC-80 en polvo, pasando de  $1700,44 \pm 8,87$  a  $1171,18 \pm 7,95$ , mientras que el secado por aspersión la incrementó, alcanzando un valor de  $1899,97 \pm 46,39$ . Comparando con las muestras de hidrolizados, todas presentaron menor hidrofobicidad superficial ( $772,37,47$  a  $1420,23$ ) que el WPC-80 en polvo, lo que podría atribuirse a una combinación de factores previamente mencionados, entre ellos el grado de hidrólisis y el método de secado. Estas diferencias sugieren que el proceso de hidrólisis y las condiciones de procesamiento influyen en la exposición de grupos hidrofóbicos en las proteínas.

En la bibliografía también se ha reportado una reducción progresiva de la hidrofobicidad superficial en hidrolizados proteicos tras el aumento del grado de hidrólisis, atribuida al incremento de la carga molecular resultante de la ruptura de enlaces peptídicos, reduciendo de esta forma la cantidad de regiones hidrofóbicas accesibles a la sonda fluorescente utilizada (Banach et al., 2013; Schröder et al., 2017; Rukluarh et al., 2019), a diferencia de la proteína nativa donde los aminoácidos hidrofóbicos no se encuentran totalmente integrados en la estructura globular favoreciendo su localización en la superficie y, por ende, explicaría la elevada hidrofobicidad superficial (Rukluarh et al., 2019). Por su parte, Mutilangi et al. (1996) indicaron que el efecto de la hidrólisis sobre esta propiedad depende de múltiples factores como la cantidad y naturaleza de los péptidos generados y la especificidad de cada enzima, que determinan distintos

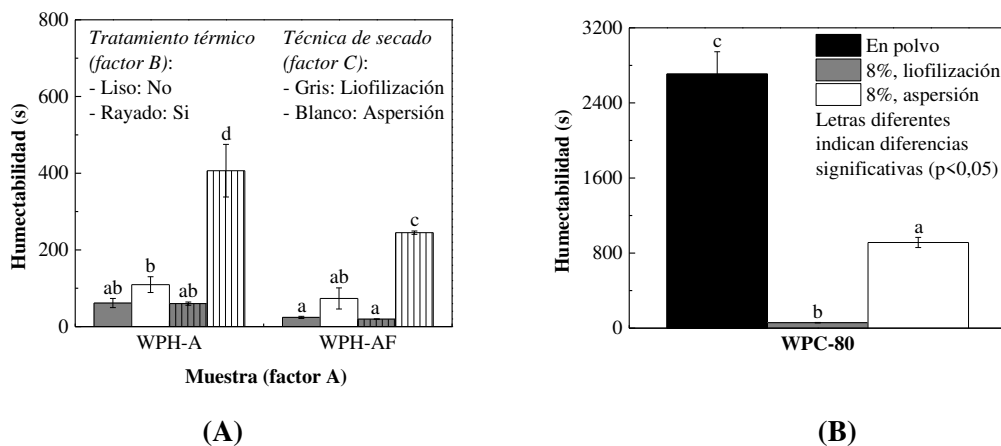
patrones de proteólisis, así como también la agregación entre péptidos, las interacciones hidrofóbicas, iónicas y por enlaces de hidrógeno, las reacciones entre grupos sulfhidrilo, que influyen en la cantidad de grupos hidrofóbicos expuestos; lo que coincide con lo concluido en la presente tesis: la hidrofobicidad superficial no solo depende del grado de hidrólisis, sino también de las características estructurales y de la composición de los péptidos formados.

En conjunto, se observó que tanto la hidrólisis de la proteína de suero lácteo como el aumento del grado de hidrólisis provocaron una reducción en la hidrofobicidad superficial de los productos obtenidos. Dado que un incremento en la hidrofobicidad superficial suele asociarse con una mejor capacidad estabilizadora de emulsiones, sería interesante evaluar esta propiedad en los hidrolizados obtenidos para confirmar si la disminución de la hidrofobicidad superficial, relacionada con la hidrólisis y el mayor grado de hidrólisis, se traduce efectivamente en una reducción de la capacidad estabilizadora de emulsiones (Acquah et al., 2018). Como demostraron Banach et al. (2013), esta relación no siempre es directa. A pesar de la disminución en la hidrofobicidad superficial observada en los hidrolizados, los autores encontraron una mejora en ciertas propiedades emulsionantes. Esto sugiere que otros factores, como el tamaño de los péptidos generados y la presencia de grupos funcionales con afinidad por la interfaz, también pueden influir en la funcionalidad emulsionante, más allá de la hidrofobicidad superficial global.

#### *4.5.2.7. Índice de humectabilidad o mojabilidad*

La humectabilidad es una de las etapas clave en el proceso de rehidratación de los polvos, en la que las partículas absorben inicialmente el agua, se sumergen en el líquido y finalmente desaparecen de la superficie libre. Esta propiedad, que se define como la capacidad de un polvo para superar la tensión superficial en la interfaz entre el líquido y las partículas, es crucial para la disolución eficiente de los productos en polvo al entrar en contacto con agua. En algunos productos, como los polvos lácteos ricos en proteínas de suero, la humectabilidad suele constituir la etapa limitante del proceso de rehidratación (Crowley et al., 2016; Seo, 2022).

Con el fin de evaluar este comportamiento en las muestras obtenidas, se determinó el índice de humectabilidad (expresado en segundos), cuyos resultados se presentan en la **Figura 69**. Se observa que el grado de hidrólisis no tuvo un efecto significativo sobre esta característica, excepto en los hidrolizados tratados térmicamente y secados por aspersión, donde un aumento del grado de hidrólisis redujo el tiempo de humectabilidad (de 406,50 a 245,00 s).



**Figura 69.** Humectabilidad de las muestras de hidrolizados (A) y controles (B) en polvo. Resultados del ANOVA de múltiples vías, correspondientes a la figura (A): -factores A, B y C e interacciones AB y BC: \*; -interacciones AC y ABC: NS; -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); -letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Respecto al tratamiento térmico, no se detectaron diferencias significativas en los hidrolizados liofilizados. Sin embargo, en los hidrolizados secados por aspersión, el tratamiento térmico incrementó el tiempo de humectabilidad (de 109 a 406 s en el WPH-A y de 73 a 245 s en el WPH-AF), lo cual puede dificultar la disolución del polvo en medios acuosos para su posterior uso. En cuanto al método de secado, no se observó un efecto significativo en los hidrolizados no tratados térmicamente al comparar liofilización y secado por aspersión. No obstante, en las muestras tratadas térmicamente, aquellas secadas por aspersión presentaron un tiempo de humectabilidad mayor que las liofilizadas (por ejemplo, 60 s en el WPH-A liofilizado frente a 406 s en el WPH-A secado por aspersión). Al analizar en conjunto las ocho muestras de hidrolizados, se destaca que las muestras con menor índice de humectabilidad corresponden a las liofilizadas.

Con respecto a los controles sin hidrolizar, ambas técnicas de secado redujeron el tiempo de humectabilidad en comparación con el WPC-80 en polvo ( $2708 \pm 238$  s), siendo la reducción más pronunciada con la liofilización. Comparando con los hidrolizados, todas las muestras mostraron menor tiempo de humectabilidad que el WPC-80 en polvo y el WPC8% secado por aspersión ( $913 \pm 54$  s). En relación con el WPC8% liofilizado ( $58 \pm 3$  s), algunas muestras de hidrolizado tuvieron valores inferiores (muestras de WPH-AF liofilizadas), otras similares (muestras de WPH-A liofilizadas) y otras superiores (muestras de WPH-A y WPH-AF secadas por aspersión).

En estudios previos, también se ha reportado una mejora de la humectabilidad tras la hidrólisis de proteínas alimentarias (Taha & Ibrahim, 2002; Ryan et al., 2022), aunque con

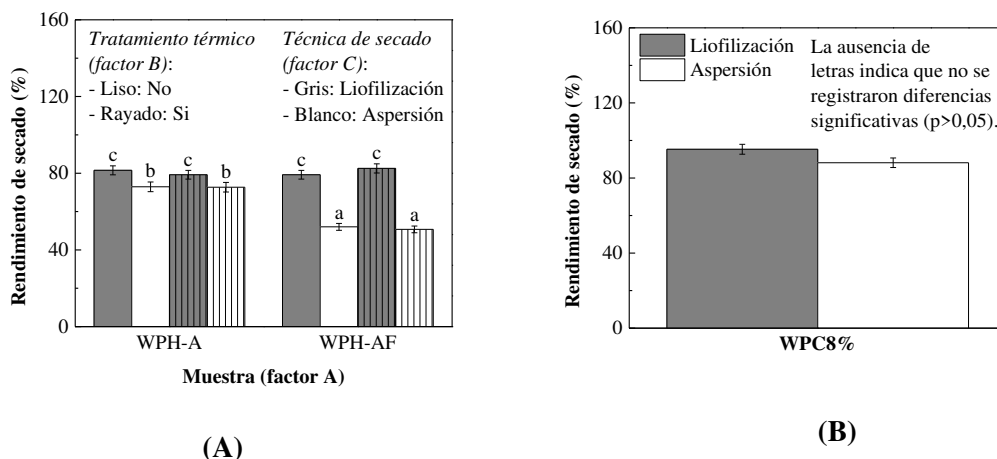
algunas diferencias. Por ejemplo, Taha & Ibrahim (2002) observaron que el aumento en el grado de hidrólisis reducía la humectabilidad, mientras que Ryan et al. (2022) reportaron un incremento conforme aumentaba el grado de hidrólisis. En cuanto al secado, Seo (2022) encontró, similar a lo observado en esta tesis, que los polvos de proteína láctea obtenidos por aspersión presentan baja humectabilidad debido a su pequeño tamaño de partícula y altas fuerzas cohesivas, lo que dificulta la reconstitución.

En líneas generales, la hidrólisis enzimática de las proteínas de suero redujo el tiempo de humectabilidad, lo que resulta muy beneficioso y necesario para lograr una disolución más rápida del producto en polvo en su aplicación final. Sin embargo, el efecto del tratamiento térmico y del método de secado debe evaluarse cuidadosamente en función del costo-beneficio. Según los resultados obtenidos, las muestras liofilizadas (independientemente del tratamiento térmico) y aquellas secadas por aspersión sin tratamiento térmico previo presentaron un comportamiento más favorable en términos de humectabilidad. No obstante, dado que la liofilización implica mayores costos operativos, se recomienda considerar su uso únicamente cuando la mejora en las propiedades funcionales lo justifique.

#### *4.5.2.8. Rendimiento de secado*

El rendimiento de secado constituye un indicador importante para la industria, ya que un mayor rendimiento implica un mayor beneficio (Tontul & Topuz, 2017). Este parámetro no solo refleja la eficiencia del proceso, sino que también condiciona la viabilidad económica del mismo. En el presente estudio, se compararon los rendimientos obtenidos mediante liofilización y secado por aspersión para las diferentes muestras.

En la **Figura 70** se presenta el rendimiento de secado de las técnicas utilizadas. Se puede observar que, en las muestras liofilizadas, los rendimientos obtenidos son similares entre los hidrolizados bajo las mismas condiciones de tratamiento térmico. Sin embargo, en las muestras secadas por aspersión, el WPH-A presentó rendimientos mayores que el WPH-AF. En cuanto al efecto del tratamiento térmico, los resultados indican que esta variable no influye en el rendimiento de secado, ya que los valores fueron similares tanto con el tratamiento como en ausencia de él. Por ejemplo, el WPH-A secado por aspersión mostró un rendimiento del 72,91% sin tratamiento térmico, mientras que con tratamiento térmico alcanzó un 72,71%. Respecto a la técnica de secado, se observó que, en todas las muestras de hidrolizados, el secado por aspersión resultó en un menor rendimiento de secado (51-73%) en comparación con la liofilización (79-83%). En las muestras control (WPC8%), aunque se observó el mismo patrón, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, con un rendimiento de  $88,13 \pm 2,55\%$  para el secado por aspersión y  $95,31 \pm 2,64\%$  para la liofilización.



**Figura 70.** Rendimiento de secado de las muestras de hidrolizados (A) y controles (B) en polvo. Resultados del ANOVA de múltiples vías, correspondientes a la figura (A): -factores A y C e interacción AC: \*; -factor B e interacciones AB, BC y ABC: NS; -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ); -letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Al analizar las ocho muestras de hidrolizados, aquellas con menor rendimiento corresponden a las secadas por aspersion. No obstante, los resultados obtenidos para el secado por aspersion pueden considerarse exitosos, ya que los valores de rendimiento superaron el 50%, umbral mínimo reportado como aceptable en la literatura (Tontul & Topuz, 2017). Estos resultados permiten concluir que, si bien la liofilización presentó mayores rendimientos, el secado por aspersion constituye una alternativa viable (y más económica) para operar a mayor escala.

Pellicer et al. (2019) evaluaron el rendimiento de secado de un saborizante de fresa microencapsulado mediante las metodologías de aspersion, liofilización y lecho fluidizado. Al igual que en esta tesis, encontraron que la liofilización presentó el mayor rendimiento de secado, con valores entre 87 y 88%, y pérdidas de rendimiento significativamente menores (12-13%) en comparación con el secado por aspersion (38%) y el lecho fluidizado (68%). Los autores señalaron que el secado por aspersion se realizó con una alta temperatura de entrada y una velocidad de bomba lenta para minimizar las pérdidas. Explicaron que, durante este proceso, el flujo de gas tiene un efecto limitado en las propiedades del producto, mientras que la velocidad de la bomba determina la tasa de alimentación de la solución. Si la velocidad de la bomba es demasiado alta, el agua no se evapora completamente en el tiempo disponible, y el polvo resultante no alcanza un secado adecuado; por otro lado, si la temperatura de entrada es baja, el polvo retiene humedad y tiende a adherirse a las paredes de la cámara, reduciendo así el rendimiento de secado. A pesar de las precauciones adoptadas, si bien el secado por aspersion logró superar el rendimiento del lecho fluidizado, no alcanzó el rendimiento obtenido mediante liofilización. Sin embargo, a partir de los resultados reportados por estos autores sobre el

contenido de humedad de las muestras, es posible establecer algunas hipótesis. Pellicer et al. (2019) observaron que el secado por aspersión produjo el menor contenido de humedad (1,9-2,3%), en comparación con la liofilización (3,9-4,1%) y el lecho fluidizado (3,8-4,6%). Estos resultados, en comparación con los obtenidos en la presente tesis (donde las muestras liofilizadas presentaron mayor rendimiento de secado, pero también menor contenido de humedad), permiten suponer que el menor rendimiento del secado por aspersión por estos autores podría estar relacionado con una mayor eficiencia en la eliminación de agua. Es decir, al remover mayor contenido de agua, se obtiene menos peso final de polvo seco (y por ende un menor rendimiento). En cambio, en las muestras liofilizadas, el mayor rendimiento observado podría deberse, al menos en parte, a la retención de una mayor cantidad de agua residual, lo que se traduce en un mayor peso, pero no necesariamente en una mayor cantidad de sólidos secos.

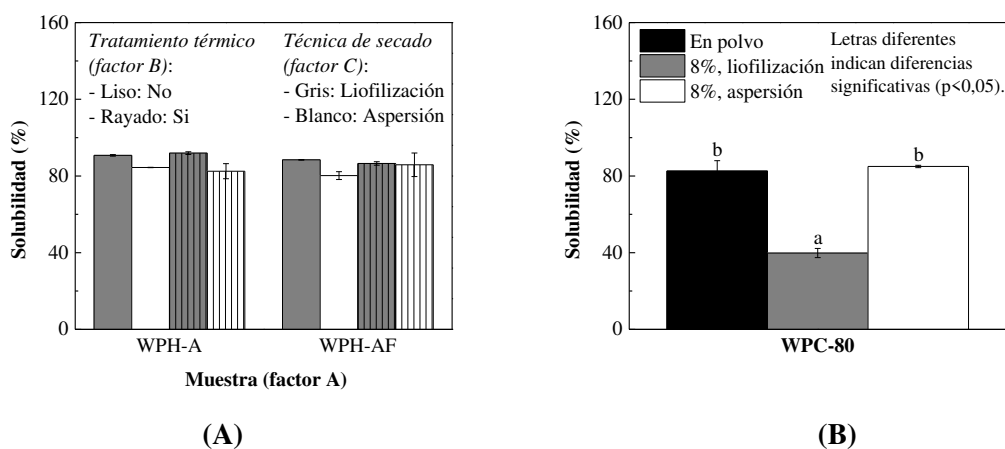
Para concluir, tanto el secado por aspersión como la liofilización permitieron obtener productos en polvo con una recuperación superior al 50%, lo cual indica un desempeño aceptable de ambos procesos. No obstante, la liofilización se destacó en este aspecto, alcanzando valores de rendimiento superiores al 80%. Desde el punto de vista industrial, sería relevante evaluar el equilibrio entre rendimiento, costo operativo y escalabilidad, ya que la liofilización, si bien ofrece mayores recuperaciones, implica mayores costos, necesidad de infraestructura especial y tiempos de procesamiento más prolongados (en comparación con el secado por aspersión).

#### *4.5.2.9. Solubilidad*

La solubilidad es una de las propiedades fisicoquímicas y funcionales más relevantes de las proteínas, ya que influye directamente en su comportamiento en soluciones acuosas (Chen et al., 2012; Tang et al., 2019). Durante la reconstitución de un polvo, esta propiedad incide no solo en la facilidad de disolución, sino también en el desempeño tecnofuncional y biofuncional de los ingredientes proteicos dentro de formulaciones alimentarias (Kleekayai et al., 2022). Por ello, se la considera una herramienta clave para evaluar la calidad funcional de los polvos proteicos (Tang et al., 2019).

En este contexto, en la **Figura 71** se presenta el porcentaje de solubilidad de las muestras obtenidas, las cuales mostraron valores superiores al 80%. Se observa que, tanto el grado de hidrólisis como el tratamiento térmico no tuvieron efecto significativo sobre la solubilidad de las muestras de hidrolizado. Este comportamiento coincide con lo observado previamente para los hidrolizados obtenidos con enzimas en estado libre (Eberhardt, 2025), donde tampoco se evidenció una influencia del grado de hidrólisis sobre esta propiedad. Sin embargo, la técnica de secado sí tuvo un efecto marcado: el secado por aspersión redujo la solubilidad de los hidrolizados en comparación con la liofilización. Por ejemplo, el WPH-A sin tratar térmicamente presentó un 84,45% de solubilidad con secado por aspersión frente a un 90,77% con liofilización. Al agrupar

en conjunto las ocho muestras de hidrolizados, se destaca que en las muestras con menor solubilidad predominan aquellas secadas por aspersión.



**Figura 71.** Solubilidad de las muestras de hidrolizados (A) y controles (B) en polvo. Resultados del ANOVA de múltiples vías, correspondientes a la figura (A): -factores A y B e interacciones AB, AC, BC y ABC: NS; -factor C: \*; -\*: efecto significativo (p<0,05); -NS: efecto no significativo (p>0,05).

En cuanto a los controles, se observó que el WPC-80 en polvo (82,57±5,41%) y el WPC8% secado por aspersión (84,97±0,62%) presentaron porcentajes de solubilidad similares y superiores al control de WPC8% liofilizado (39,82±2,39%). En comparación con las muestras de hidrolizados (80-92%), sus valores de solubilidad fueron cercanos y levemente superiores a los del WPC-80 en polvo y WPC8% secado por aspersión y, por ende, superiores al WPC8% liofilizado. Estos resultados coinciden con lo reportado para los hidrolizados obtenidos con las enzimas en estado libre. Si bien todas las muestras analizadas por Eberhardt (2025) presentaron alta solubilidad (>80%), la hidrólisis enzimática incrementó aún más esta propiedad, alcanzándose valores superiores al 98% en los hidrolizados.

En la bibliografía se han reportado resultados similares (Cui et al., 2021; Ryan et al., 2022; Kruchinin et al., 2025) en cuanto al efecto de la hidrólisis sobre la solubilidad de la proteína inicial, destacando que, en algunos casos (Cui et al., 2021; Ryan et al., 2022) el grado de hidrólisis influyó positivamente sobre la solubilidad de las muestras.

En el presente estudio, la hidrólisis enzimática mejoró la solubilidad del concentrado de suero lácteo y dicha propiedad no se vio afectada por el grado de hidrólisis ni por el tratamiento térmico aplicado. En cuanto a las técnicas de secado, si bien su evaluación no tuvo como objetivo mejorar las propiedades funcionales sino determinar el efecto que podrían ejercer sobre ellas, se observaron mayores valores de solubilidad en las muestras liofilizadas. Sin embargo, el secado por aspersión es un método ampliamente utilizado en la industria para preservar ingredientes

proteicos debido a su eficiencia en costos y escalabilidad por lo que sería importante considerar si la diferencia observada en solubilidad, y en otras propiedades funcionales evaluadas, justifica la elección de un método de secado sobre otro, en función de los requerimientos específicos del producto final.

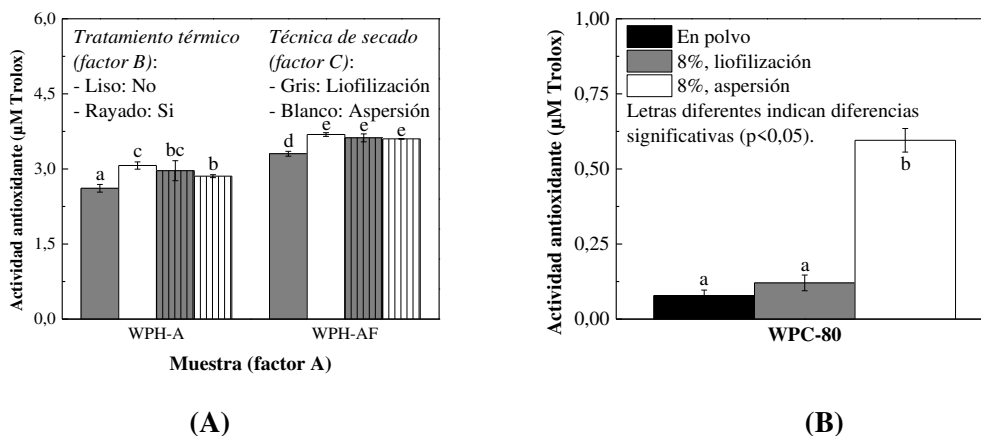
#### 4.5.2.10. *Actividad antioxidante*

Como se mencionó en secciones anteriores, los péptidos con propiedades antioxidantes representan una alternativa interesante y sostenible, tanto desde el punto de vista sanitario como industrial. Desde la perspectiva de la salud, estos compuestos pueden contribuir al tratamiento de diversas enfermedades sin generar los efectos secundarios característicos de los fármacos de origen químico. Por otro lado, en el ámbito industrial, constituyen potenciales aditivos alimentarios más seguros en comparación con los aditivos sintéticos (Zou et al., 2016; Sah et al., 2018).

En este contexto, se evaluó la actividad antioxidante de las muestras de hidrolizados obtenidas, así como de las muestras control. Los resultados se presentan en la **Figura 72**, donde se puede observar que la hidrólisis enzimática efectivamente liberó péptidos con actividad antioxidante que se encontraban encriptados en la proteína nativa (Luparelli et al., 2025): las muestras control mostraron valores de actividad antioxidante comprendidos entre 0,08 y 0,60  $\mu\text{M}$ , mientras que las muestras de hidrolizados presentaron un rango notoriamente superior, entre 2,61 y 3,69  $\mu\text{M}$ . Este comportamiento se asemeja a lo observado por Eberhardt (2025), quien, al trabajar con concentraciones en el rango de 0,2 a 5% (m/v), reportó que la actividad antioxidante de los hidrolizados obtenidos con las enzimas en estado libre fue más de 3 veces superior a la de las muestras control (WPC-80 sin hidrolizar). Sin embargo, Eberhardt (2025) no encontró un efecto significativo del grado de hidrólisis sobre la actividad antioxidante en las condiciones evaluadas (distintas concentraciones y valores de pH), salvo en casos puntuales en los que registró una reducción de la bioactividad. Este patrón difiere, en parte, de los resultados obtenidos en la presente tesis, donde el aumento en el grado de hidrólisis de 15 a 19% condujo a un incremento de la actividad antioxidante. Sin embargo, es posible que una hidrólisis superior al 19% no necesariamente lleve a una mejora adicional de la bioactividad, o incluso podría reducirla, tal como se mencionó al discutir los resultados de hidrólisis con *Alcalase*® en estado libre (**sección 4.2.2.1**), donde aumentos mayores en el grado de hidrólisis no generaron incrementos significativos en la actividad antioxidante (You et al., 2009; Wang et al., 2016; Martínez-Montaña, 2022).

Respecto al tratamiento térmico post-hidrólisis y la técnica de secado, se observaron comportamientos diferenciados en función de las condiciones aplicadas. Por un lado, el tratamiento térmico provocó un aumento de esta bioactividad en las muestras de hidrolizados

liofilizadas, mientras que en las muestras secadas por aspersión la redujo o no generó cambios significativos. Por otro lado, los hidrolizados secados por aspersión mostraron valores de actividad antioxidante superiores a los liofilizados cuando no se aplicó el tratamiento térmico luego de la hidrólisis; sin embargo, no se registraron diferencias significativas entre ambos métodos de secado cuando las muestras fueron sometidas al tratamiento térmico. Estos resultados fueron consistentes con lo reportado en la bibliografía, en relación con que la técnica de secado puede afectar, o no, esta propiedad bioactiva dependiendo de la composición y secuencia de los péptidos obtenidos, las condiciones de hidrólisis, así como del método empleado para evaluar la actividad antioxidante. En este contexto, algunos autores no observaron un efecto significativo del método de secado sobre dicha actividad (Chen et al., 2012), mientras que otros informaron una mayor capacidad antioxidante en muestras secadas por aspersión, atribuida a la reorganización de aminoácidos libres en dipéptidos y tripéptidos durante el secado (Dong et al., 2022) o a la mayor proporción de péptidos de bajo peso molecular (<1 kDa) generada por este proceso (Kleekayai et al., 2022).



**Figura 72.** Actividad antioxidante de hidrolizados (A) y controles (B). Resultados del ANOVA de múltiples vías, correspondientes a la figura (A): -factores A, B y C e interacción BC: \*; -interacciones AB, AC y ABS: NS; -\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ); -NS: efecto no significativo; -letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a las muestras control, se observó que la preparación al 8% (m/v) en proteínas seguida de liofilización no afectó la actividad antioxidante del WPC-80 en polvo. En cambio, la misma preparación seguida de secado por aspersión produjo un incremento en la bioactividad respecto al WPC-80 en polvo, lo que sugiere que la temperatura empleada durante el secado por aspersión podría haber inducido modificaciones estructurales leves en las proteínas, tales como desnaturalización parcial o exposición de aminoácidos con capacidad antioxidante, favoreciendo de esta forma la actividad observada.

En resumen, la hidrólisis enzimática del WPC-80 mediante enzimas inmovilizadas permitió obtener hidrolizados con una actividad antioxidante significativamente mayor que la del sustrato original. La bioactividad se incrementó con el grado de hidrólisis, aunque este aumento debe evaluarse de manera balanceada considerando tanto las propiedades funcionales finales del hidrolizado como los costos de producción asociados al tiempo de reacción. Estos resultados resaltan la importancia de seleccionar un grado de hidrólisis óptimo que maximice la funcionalidad sin comprometer la eficiencia económica del proceso.

## **CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

La caracterización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® (desde los aspectos bioquímico, funcional y cinético) permitió obtener una comprensión integral del comportamiento de ambos preparados comerciales frente a distintas condiciones experimentales. Se identificó que los mejores rendimientos de hidrólisis de caseína se alcanzaron a 65-70°C y pH 8,5-9 para *Alcalase*®, y a 50°C y pH 7,5 para *Flavourzyme*®. Además, mostraron una estabilidad térmica destacable en los rangos de 50 a 65°C (*Alcalase*®) y de 40 a 45°C (*Flavourzyme*®). En estos rangos, las enzimas manifestaron la mayor estabilidad a las temperaturas más bajas evaluadas, con los valores más altos de vida media y los menores coeficientes de inactivación, además de valores positivos en entalpía, entropía y energía libre. Respecto al pH, *Alcalase*® mostró mejores condiciones de estabilidad entre pH 6 y 8,5, mientras que *Flavourzyme*® se comportó con una mejor estabilidad a pH 6,5 y 8. Estos resultados serían claves para la optimización de procesos industriales, ya que el rendimiento de las enzimas (y por ende de los resultados a obtener) dependerá directamente de las condiciones de trabajo.

En cuanto a los estudios cinéticos, se observó una relación directa entre la velocidad de reacción y la concentración enzimática, reflejada en el aumento de la  $V_{max}$ , así como la posible presencia de inhibición por producto, evidenciada en el incremento de  $k_{0,5}$ . En la evaluación de productividad, se detectó un aumento de la actividad enzimática al aumentar el tiempo de reacción, la temperatura y el pH (hasta los valores de pH de mayor rendimiento de hidrólisis: 9 para *Alcalase*® y 7,5 para *Flavourzyme*®), lo que permitió identificar las condiciones más adecuadas para procesos hidrolíticos de larga duración. Asimismo, el estudio del efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática destacó la importancia de evaluar específicamente cada ion, así como su concentración, ya que estos factores pueden influir en el rendimiento de la hidrólisis.

La hidrólisis del concentrado de proteína de suero lácteo al 7% (m/v) utilizando la enzima *Alcalase*® permitió obtener hidrolizados con altos grados de hidrólisis (22,1 y 29,1%), que demostraron efectos antioxidantes y antihipertensivos significativamente superiores a los controles (DH <2%), posicionándolos como potenciales ingredientes para formulaciones alimentarias funcionales. Un aspecto clave es que las bioactividades detectadas no se vieron afectadas por el pH; mientras que, la concentración de los hidrolizados tuvo un impacto estadísticamente significativo sobre ambas bioactividades, presentándolo como un factor crítico a considerar en la posible formulación de alimentos funcionales. Finalmente, los resultados indicaron que una hidrólisis limitada resultaría ser la estrategia más adecuada, ya que no solo optimiza los tiempos de producción (37 min en lugar de 227 min), sino que también preserva las

propiedades bioactivas y tecnofuncionales, las cuales podrían verse comprometidas ante procesos de hidrólisis extensos.

La caracterización de los hidrolizados mediante distintas técnicas separativas permitió identificar fracciones peptídicas responsables de sus bioactividades. La actividad antioxidante se asoció principalmente a la presencia de residuos con carga negativa, como los aminoácidos ácido glutámico y ácido aspártico, los cuales, al poseer un exceso de electrones, tienen una mayor capacidad de neutralizar radicales libres, en comparación con otros residuos aminoacídicos. Además, esta bioactividad mostró una mayor relación con residuos hidrofóbicos alifáticos que con residuos aromáticos. Por su parte, la actividad antihipertensiva se relacionó con la presencia de residuos cargados y con residuos hidrofóbicos aromáticos. En particular, se destacó el papel de lisina y arginina en la interacción con el sitio activo de la enzima convertidora de angiotensina, así como el papel de los residuos aromáticos al bloquear estéricamente dicho sitio. Estos residuos desempeñan una función clave en la actividad antihipertensiva, especialmente cuando se encuentran ubicados en el extremo C-terminal. En términos de peso molecular, la mayoría de los péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados de suero presentaron valores inferiores a 1 kDa.

Los ensayos preliminares de caracterización de las partículas de quitosano evidenciaron que, tanto el pH del medio como la modificación con glutaraldehído, influyeron significativamente sobre su capacidad de hinchamiento y sus características morfológicas. Las partículas sintetizadas presentaron una morfología predominantemente esférica y mostraron un aumento progresivo de su hinchamiento a lo largo del tiempo, particularmente a pH 7. Sin embargo, en condiciones alcalinas (pH 10), la capacidad de hinchamiento disminuyó notoriamente, especialmente en las partículas nativas. En cuanto al efecto del glutaraldehído, se observó una reducción general de la capacidad de hinchamiento, atribuible a una mayor rigidez de la red polimérica generada por la reticulación. Desde el punto de vista morfológico, el tratamiento con glutaraldehído indujo un cambio hacia partículas con superficies más rugosas, porosas y compactas, lo que sugiere una reorganización estructural del polímero. Estos cambios podrían resultar beneficiosos para aplicaciones de inmovilización enzimática, al aumentar el área superficial disponible y mejorar la estabilidad estructural del soporte.

Los estudios de producción de derivados permitieron evaluar distintas técnicas de insolubilización de las enzimas. Si bien la adsorción física es una técnica de inmovilización sencilla y de bajo costo en donde no se generan cambios estructurales profundos ni en la especificidad de las enzimas, la probable fuga de moléculas enzimáticas llevó a bajos rendimientos de inmovilización tanto en términos de proteína como de actividad. En cuanto a la inmovilización por reticulación, esta técnica tiene como gran ventaja no emplear ningún tipo de soporte, aunque se realizó seguidamente una inmovilización covalente del CLEA sobre partículas

de quitosano. Sin embargo, la reticulación enzimática puede conducir a la formación de agregados con poca o nula actividad. El entrecruzamiento entre moléculas de enzimas a través de sitios catalíticos o lugares cercanos a ellos, probablemente dificultó la hidrólisis de caseína evaluada luego de la inmovilización. Estos resultados se observaron no solo durante el estudio de las distintas técnicas de inmovilización, sino también en los controles realizados para los ensayos posteriores. En cuanto a la inmovilización mediada por uniones covalentes, los rendimientos en términos de actividad estuvieron entre los más altos obtenidos (87% para *Alcalase*® y 63% para *Flavourzyme*®), lo que evidencia una fijación eficiente de la enzima al soporte. No obstante, es importante considerar que este tipo de unión puede restringir la movilidad de la enzima, limitando los cambios conformacionales necesarios para la catálisis, lo que puede ocasionar una reducción de su actividad respecto a la actividad ofrecida al inicio de la inmovilización. A pesar de estas posibles limitaciones, las ventajas asociadas a la inmovilización covalente (como su alta estabilidad, baja pérdida de enzima, y la posibilidad de recuperación y reutilización) suelen superarlas ampliamente, lo que la convierte en una de las estrategias más utilizadas y factibles para aplicaciones industriales.

En esta línea, estos estudios permitieron conocer el efecto de la concentración de glutaraldehído sobre la inmovilización de las enzimas. El uso de una baja concentración de agente activante implicaría una menor cantidad de grupos funcionales capaces de reaccionar con ciertos aminoácidos de las enzimas y, por lo tanto, un menor rendimiento de inmovilización. Por ejemplo, con 0,05% de glutaraldehído tras 4 h de inmovilización, *Alcalase*® mostró un  $\eta_p$  del 60% y un  $\eta_a$  del 24%, mientras que *Flavourzyme*® presentó un  $\eta_p$  de 4% y un  $\eta_a$  de 46%. La lixiviación o fuga de moléculas enzimáticas se relaciona con este tipo de resultados. En contraposición, el uso de una alta concentración de agente activante permitiría un mayor número de uniones entre enzima y soporte, lo que evita los problemas de fuga de moléculas de enzima. Por ejemplo, con 1 y 2% de glutaraldehído tras 4 h de inmovilización, *Alcalase*® evidenció un  $\eta_p$  de 82 y 61%, respectivamente, y un  $\eta_a = 78$  y 78%, mientras que *Flavourzyme*® mostró un  $\eta_p$  de 24 y 28% y un  $\eta_a$  de 34 y 40%. Sin embargo, un exceso de uniones enzima-soporte puede ocasionar la distorsión de la conformación enzimática, impedimentos estéricos e incluso la desnaturalización de las enzimas. Asimismo, los estudios de inmovilización en función del tiempo mostraron que la inmovilización mejora la cantidad de proteína unida y la actividad enzimática solo hasta cierto punto, tras el cual ambos disminuyen, posiblemente debido a la reducción de sitios activos y a la pérdida de flexibilidad de las enzimas.

De manera particular, los estudios de inmovilización de *Flavourzyme*® requirieron ensayos adicionales, ya que esta enzima demostró ser sensible a las condiciones de inmovilización inicialmente impuestas, particularmente a la concentración del agente activante utilizado. Como resultado, fue necesario emplear concentraciones más altas de *Flavourzyme*® para obtener un

derivado con capacidad catalítica. Esta sensibilidad podría atribuirse a una inmovilización inactivante, en la que la enzima se habría unido al soporte a través de sus sitios catalíticos. A esto se le suma la complejidad de la preparación enzimática comercial que, aunque proporciona una mayor selectividad en comparación con *Alcalase*®, representa un desafío significativo para su inmovilización, ya que cada una de las enzimas que la componen reaccionan de manera diferente durante este proceso debido a diferencias estructurales.

La caracterización de las enzimas inmovilizadas permitió obtener una comprensión integral de su comportamiento frente a diferentes condiciones experimentales. Esto no solo facilitó la comparación con las enzimas en estado libre, sino que también permitió evaluar su potencial en aplicaciones industriales. Se identificó que los mayores rendimientos de hidrólisis de caseína se alcanzaron a 65-70°C y pH 8 para *Alcalase*®, y a 50-55°C y pH 7-7,5 para *Flavourzyme*®. Ambas enzimas mostraron una notable estabilidad térmica en los rangos de 60-70°C (*Alcalase*®) y 35-45°C (*Flavourzyme*®). En este contexto, la temperatura óptima para la hidrólisis no coincidió con la de mayor estabilidad térmica, al igual que lo observado con las enzimas libres. En cuanto al pH, las enzimas mostraron buena estabilidad en los rangos de pH de 6 a 9 para *Alcalase*® y de 6,5 a 7,5 para *Flavourzyme*®. En estos intervalos, la mayor estabilidad se observó a pH 8 en el caso de *Alcalase*® y a pH 6,5 en *Flavourzyme*®, reflejada en una mayor vida media y menor coeficiente de inactivación. Por su parte, los estudios cinéticos revelaron una relación directa entre la velocidad de reacción y la concentración enzimática, evidenciada en un aumento de la  $V_{max}$ , así como la posible presencia de inhibición por producto, reflejada en el incremento del parámetro  $K_m$ .

En comparación con las enzimas libres, se observaron diferencias relevantes, como una mayor actividad relativa para la hidrólisis de caseína a temperaturas superiores al óptimo de cada enzima, atribuida a la estabilización inducida por la inmovilización. Por el contrario, a temperaturas inferiores al óptimo, se registraron menores actividades, posiblemente debido a impedimentos estéricos en los sitios activos tras la inmovilización. Este comportamiento fue particularmente evidente en los estudios de estabilidad térmica de *Alcalase*®, cuya estabilidad se incrementó tras la inmovilización, lo que no ocurrió con *Flavourzyme*®, donde solo se observaron mejoras en los parámetros de inactivación a 50°C. En relación con los parámetros cinéticos, se observó que, tanto en las enzimas libres como en las inmovilizadas, el incremento de la masa enzimática provocó un aumento de la  $K_m$  y de la  $V_{max}$  y se evidenció una posible inhibición por producto.

Respecto a los estudios operacionales, ambas enzimas mostraron una disminución de la actividad tras ciclos consecutivos de hidrólisis, probablemente tanto por la pérdida de moléculas enzimáticas débilmente unidas al soporte como por la inactivación térmica. No obstante,

*Alcalase*® resultó ser más estable que *Flavourzyme*®, reteniendo aproximadamente un 61% frente a un 11% de actividad tras 5 ciclos. En cuanto a la estabilidad durante el almacenamiento, se observó un comportamiento similar: *Alcalase*® presentó valores de actividad residual superiores a los de *Flavourzyme*®, con aproximadamente un 78% frente a un 35% a los 150 días. Dado que la reutilización de biocatalizadores inmovilizados es un factor clave para su viabilidad industrial, los resultados obtenidos con *Alcalase*® son prometedores. En contraste, en el caso de *Flavourzyme*®, se requiere optimizar el proceso de inmovilización para lograr una reutilización más eficiente con mínima pérdida de actividad. Asimismo, en ambos casos, son necesarios estudios adicionales para mejorar las condiciones de almacenamiento o aplicar tratamientos post-inmovilización que prevengan el crecimiento microbiano y conserven la actividad catalítica de las enzimas.

La hidrólisis del WPC-80 mediada por enzimas inmovilizadas permitió evaluar el desempeño de los biocatalizadores desarrollados y obtener dos hidrolizados con propiedades fisicoquímicas y tecnofuncionales diferenciadas. Los estudios preliminares evidenciaron una reducción en la actividad enzimática tras la inmovilización, ya que fue necesario emplear mayores cantidades de derivado enzimático para alcanzar los grados de hidrólisis establecidos. En el escalado, la *Alcalase*® inmovilizada logró alcanzar un grado de hidrólisis comparable al de la enzima libre, aunque en un tiempo ligeramente mayor. En cambio, con *Flavourzyme*® inmovilizada no se replicó el comportamiento observado en las pruebas preliminares, requiriendo tiempos más prolongados, posiblemente debido a la pérdida de actividad asociada al almacenamiento del biocatalizador.

La caracterización de los hidrolizados obtenidos evidenció modificaciones estructurales en el WPC-80 tras su hidrólisis (microscopía electrónica de barrido, FT-IR y RP-HPLC), que se tradujeron en mejoras funcionales como el aumento de la estabilidad térmica, la solubilidad, la humectabilidad y la actividad antioxidante, así como en una reducción de la hidrofobicidad superficial. En términos generales, los efectos observados en solubilidad, hidrofobicidad y actividad antioxidante fueron consistentes con lo reportado para la hidrólisis mediada con enzimas en estado libre, observándose algunas diferencias en el contenido de humedad.

El aumento del grado de hidrólisis (de 15 a 19%) generó diferencias estructurales y en el perfil peptídico, con impacto en propiedades como el contenido de humedad, la hidrofobicidad superficial, propiedades antioxidantes, y, en las muestras secadas por aspersión, también en el rendimiento de secado. Sin embargo, no se detectaron efectos significativos del grado de hidrólisis sobre la solubilidad, la humectabilidad ni el rendimiento de secado de las muestras liofilizadas. Estos resultados refuerzan la importancia de considerar no solo el grado de hidrólisis, sino también la composición y distribución peptídica en el diseño de ingredientes funcionales.

En relación con el tratamiento térmico post-hidrólisis, este no mostró efectos relevantes en la mayoría de los análisis realizados (TGA, SEM, hidrofobicidad superficial, solubilidad y rendimiento de secado), aunque sí influyó positivamente en la humectabilidad de las muestras secadas por aspersión y produjo algunas variaciones en los resultados de FT-IR, RP-HPLC, contenido de humedad y actividad antioxidante. Por su parte, el método de secado demostró ser un factor clave: la liofilización permitió obtener productos con mayor solubilidad, menor contenido de humedad, mejor rendimiento de secado y, en muestras tratadas térmicamente, una mejor humectabilidad. En conjunto, los resultados obtenidos resaltan el impacto de la hidrólisis enzimática, del grado de hidrólisis, del tratamiento térmico post-hidrólisis y del método de secado sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales del WPC-80. Esta información es de gran valor para el desarrollo de ingredientes proteicos con funcionalidades adaptadas a aplicaciones industriales que involucren procesos térmicos, sistemas en polvo reconstituibles o formulaciones que requieran alta solubilidad y humectabilidad.

A futuro, sería valioso investigar las interacciones de estos hidrolizados con otros ingredientes alimentarios bajo diferentes condiciones de procesamiento, a fin de optimizar su incorporación en matrices complejas y desarrollar nuevas formulaciones alimentarias funcionales. Además, sería muy importante evaluar el comportamiento de la matriz formulada y, fundamentalmente, las propiedades previamente asociadas a los hidrolizados frente a protocolos establecidos para técnicas de digestión gastrointestinal *in vitro*. Claramente, a través de los resultados integralmente obtenidos y presentados en este trabajo de Tesis Doctoral, se ha buscado contribuir a la valorización y aprovechamiento del subproducto lactosuero como posible materia prima de alto valor agregado, además de promover el desarrollo y la obtención a gran escala de nuevos ingredientes que resulten de interés para el sector industrial alimenticio.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S. (2017). Preparation, properties, and uses of enzymatic milk protein hydrolysates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1119-1132. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.899200>

Abdel-Naby, M. A., Ahmed, S. A., Wehaidy, H. R., & El-Mahdy, S. A. (2017). Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearothermophilus* alkaline protease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 265-271. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.094>

Abdullah, F. I., Hamid, N. H., Abd Karim, M. M., Ismail, M. F., Sin, N. L. W. W., & Kamaruddin, M. S. (2024). Fish protein hydrolysate for fish health. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 103292. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103292>

Acquah, C., Di Stefano, E., & Udenigwe, C. C. (2018). Role of hydrophobicity in food peptide functionality and bioactivity. *Journal of Food Bioactives*, 4, 88-98. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.4164>

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>

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York.

Adriano, W. S., Mendonça, D. B., Rodrigues, D. S., Mammarella, E. J., & Giordano, R. L. (2008). Improving the properties of chitosan as support for the covalent multipoint immobilization of chymotrypsin. *Biomacromolecules*, 9(8), 2170-2179. <https://doi.org/10.1021/bm8002754>

Agyei, D., & Danquah, M. K. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology advances*, 29(3), 272-277. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.001>

Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 244-256. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.003>

Ahmed, T., Juhász, A., Bose, U., Terefe, N. S., & Colgrave, M. L. (2024). Research trends in production, separation, and identification of bioactive peptides from fungi—A critical review. *Journal of Functional Foods*, *119*, 106343. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2024.106343>

Ait Braham, S., Hussain, F., Morellon-Sterling, R., Kamal, S., Kornecki, J. F., Barbosa, O., ... & Fernandez-Lafuente, R. (2019). Cooperativity of covalent attachment and ion exchange on alcalase immobilization using glutaraldehyde chemistry: Enzyme stabilization and improved proteolytic activity. *Biotechnology Progress*, *35*(2), e2768. <https://doi.org/10.1002/btpr.2768>

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), 1445. <https://doi.org/10.3390/ijms23031445>

Alavi, F., & Ciftci, O. N. (2023). Purification and fractionation of bioactive peptides through membrane filtration: A critical and application review. *Trends in Food Science & Technology*, *131*, 118-128. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.11.024>

Alizadeh, O., & Aliakbarlu, J. (2020). Effects of ultrasound and ohmic heating pretreatments on hydrolysis, antioxidant and antibacterial activities of whey protein concentrate and its fractions. *LWT*, *131*, 109913. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109913>

Alpay, P., & Uygun, D. A. (2015). Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *111*, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.001>

Andiana, P., Al Awwaly, K. U., & Manab, A. (2023). The potential of meat and slaughterhouse by-products as sources of bioactive peptides: A literature review. *BIO Web of Conferences*, *81*, 00010. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20238100010>

Anjani, K., Kailasapathy, K., & Phillips, M. (2007). Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal*, *17*(1), 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.005>

Anon, M. C., Quiroga, A., Scilingo, A., & Tironi, V. (2023). Plant bioactive peptides: From oilseed, legume, cereal, fruit, and vegetable. In S. M. Jafari et al. (eds.), *Handbook of Food Bioactive Ingredients: Properties and Applications* (pp. 907-940). Springer International Switzerland AG. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-28109-9\\_18#DOI](https://doi.org/10.1007/978-3-031-28109-9_18#DOI)

Antony, R., Arun, T., & Manickam, S. T. D. (2019). A review on applications of chitosan-based Schiff bases. *International Journal of Biological Macromolecules*, *129*, 615-633. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.047>

AOAC International. (2000). Official Method 925.10 – Moisture in flour. In *Official Methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.). Gaithersburg, MD: AOAC International.

Arroyo, D. M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39. En internet: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/6008>

Asas, C., Llanos, C., Matavaca, J., & Verdezoto, D. (2021). El lactosuero: impacto ambiental, usos y aplicaciones vía mecanismos de la biotecnología. *Agroindustrial Science*, 11(1), 105-116. <http://dx.doi.org/10.17268/agroind.sci.2021.01.13>

Aslan, Y., Ömerosmanoğlu, D., & Koç, E. Ö. (2018). Covalent immobilization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(6), 595-604. <https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0155>

Bai, Y., & Wu, W. (2022). The neutral protease immobilization: physical characterization of sodium alginate-chitosan gel beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(5), 2269-2283. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03773-9>

Ballatore, M. B., Escobar, F. M., Rossi, Y. E., del Rosario Bettiol, M., Torres, C. V., Montenegro, M. A., & Cavaglieri, L. R. (2021). Cytotoxic activity and genotoxicity of antioxidant WPC-hydrolysates and their probiotics compatibility as Potential Functional Feed Additive. *Food Bioscience*, 41, 100922. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100922>

Bamdad, F., Bark, S., Kwon, C. H., Suh, J. W., & Sunwoo, H. (2017). Anti-inflammatory and antioxidant properties of peptides released from  $\beta$ -lactoglobulin by high hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis. *Molecules*, 22(6), 949. <https://doi.org/10.3390/molecules22060949>

Banach, J. C., Lin, Z., & Lamsal, B. P. (2013). Enzymatic modification of milk protein concentrate and characterization of resulting functional properties. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.023>

Banerjee, K., Das, B., & Gangopadhyay, G. (2012). Entropic estimate of cooperative binding of substrate on a single oligomeric enzyme: An index of cooperativity. *The Journal of Chemical Physics*, 136(15). <https://doi.org/10.1063/1.3703505>

Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., & Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *Rsc Advances*, 4(4), 1583-1600. <https://doi.org/10.1039/C3RA45991H>

Bashir, N., Sood, M., & Bandral, J. D. (2020). Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 254-261. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2d.8779>

Bhandari, S., Gupta, V. K., & Singh, H. (2009). Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads. *Biocatalysis and Biotransformation*, 27(1), 71-77. <https://doi.org/10.1080/10242420802607918>

Bhunia, B., Basak, B., Mandal, T., Bhattacharya, P., & Dey, A. (2013). Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa). *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.024>

Bhut, B. V., Weaver, J., Carter, A. R., Wickramasinghe, S. R., & Husson, S. M. (2011). The role of polymer nanolayer architecture on the separation performance of anion-exchange membrane adsorbers: I. Protein separations. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(11), 2645-2653. <https://doi.org/10.1002/bit.23221>

Bilal, M., Jing, Z., Zhao, Y., & Iqbal, H. M. (2019). Immobilization of fungal laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads and its bio-catalytic potential to degrade bisphenol A. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 19, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101174>

Blanco-Llamero, C., García-García, P., & Señoráns, F. J. (2021). Cross-linked enzyme aggregates and their application in enzymatic pretreatment of microalgae: Comparison between CLEAs and combi-CLEAs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 794672. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.794672>

Bolivar, J. M., Woodley, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2022). Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. *Chemical Society Reviews*, 51(15), 6251-6290. <https://doi.org/10.1039/D2CS00083K>

Bommarius, A. S., & Paye, M. F. (2013). Stabilizing biocatalysts. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6534-6565. <https://doi.org/10.1039/C3CS60137D>

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Cacciutto, M., Calvo, M. A., & Calo, M. C. (2023). *Proteínas del suero lácteo: propiedades e implementación terapéutica nutricional* [Trabajo final de grado, Universidad FASTA]. Repositorio AGRIS.

<https://agris.fao.org/search/en/providers/124855/records/6851436153e52c13fc75d41b>

Camacho, F., González-Tello, P., Páez-Dueñas, M. P., Guadix, E. M., & Guadix, A. (2001). Correlation of base consumption with the degree of hydrolysis in enzymic protein hydrolysis. *Journal of Dairy Research*, 68(2), 251-265.

<https://doi.org/10.1017/S0022029901004824>

Campos, E., Coimbra, P., & Gil, M. H. (2013). An improved method for preparing glutaraldehyde cross-linked chitosan–poly (vinyl alcohol) microparticles. *Polymer Bulletin*, 70, 549-561. <https://doi.org/10.1007/s00289-012-0853-4>

Cardamone, M., & Puri, N. (1992). Spectrofluorimetric assessment of the surface hydrophobicity of proteins. *Biochemical Journal*, 282(2), 589-593.

<https://doi.org/10.1042/bj2820589>

Cardoso, M. M., Manzo, R. M., Tonarelli, G. G., & Simonetta, A. C. (2012). Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of *Enterococcus faecalis* DBFIQ E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), 568-577. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2012.00852.x>

Catana, R., Eloy, M., Rocha, J. R., Ferreira, B. S., Cabral, J. M. S., & Fernandes, P. (2007). Stability evaluation of an immobilized enzyme system for inulin hydrolysis. *Food Chemistry*, 101(1), 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.042>

Chalamaiah, M., Ulug, S. K., Hong, H., & Wu, J. (2019). Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. *Journal of Functional Foods*, 58, 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.050>

Chamata, Y., Watson, K. A., & Jauregi, P. (2020). Whey-derived peptides interactions with ACE by molecular docking as a potential predictive tool of natural ACE inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 864. <https://doi.org/10.3390/ijms21030864>

Chang, Y. B., Kim, H., Lee, S. K., Kim, H. J., Jeong, A. H., Suh, H. J., & Ahn, Y. (2023). Characteristics and absorption rate of whey protein hydrolysates prepared using Flavourzyme after treatment with Alcalase and Protamex. *Molecules*, 28(24), 7969. <https://doi.org/10.3390/molecules28247969>

Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 8(6), 238. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>

Chegini, G., HamidiSepehr, A., Dizaji, M. F., & Mirnezami, S. V. (2014). Study of physical and chemical properties of spray drying whey powder. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 3, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s40093-014-0062-2>

Cheison, S. C., & Kulozik, U. (2017). Impact of the environmental conditions and substrate pre-treatment on whey protein hydrolysis: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 418-453. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.959115>

Chen, C., Chi, Y. J., & Xu, W. (2012). Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2342-2352. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0606-7>

Chen, M., Ma, A., Sun, Z., Xie, B., Shi, L., Chen, S., ... & Wu, W. (2023). Enhancing activity of food protein-derived peptides: An overview of pretreatment, preparation, and modification methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(6), 4698-4733. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13238>

Chen, Z., Wang, X., Chen, Y., Xue, Z., Guo, Q., Ma, Q., & Chen, H. (2018). Preparation and characterization of a novel nanocomposite with double enzymes immobilized on magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan-sodium tripolyphosphate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 169, 280-288. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.066>

Chutinara, C., Sagis, L. M., & Landman, J. (2024). Interfacial rheological properties of pepsin-hydrolyzed lentil protein isolate at oil-water interfaces. *Food Hydrocolloids*, 155, 110201. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110201>

Cian, R. E., Luggren, P., & Drago, S. R. (2011). Effect of extrusion process on antioxidant and ACE inhibition properties from bovine haemoglobin concentrate hydrolysates incorporated into expanded maize products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(7), 774-780. <https://doi.org/10.3109/09637486.2011.582034>

Colleary, S., & Ó Fágáin, C. (2008). Chemically stabilized subtilisins in peptide synthesis. In W. G. Flynne (Ed.), *Biotechnology and Bioengineering* (pp. 75-97). Nova Science Publishers. [https://doras.dcu.ie/575/1/biotech\\_bioeng\\_chapter\\_2008.pdf](https://doras.dcu.ie/575/1/biotech_bioeng_chapter_2008.pdf)

Colmenares, Á. P. A., Suárez, G. A. P., Báez, Y. T. C., Nova, C. D. J. M., & Sakharov, I. Y. (2023). Aplicaciones del lactosuero y sus derivados proteínicos. *Ciencia en Desarrollo*, 14(2), 139-155. <https://doi.org/10.19053/01217488.v14.n2.2023.15002>

Conesa, C., & FitzGerald, R. J. (2013). Total solids content and degree of hydrolysis influence proteolytic inactivation kinetics following whey protein hydrolysate manufacture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(42), 10135-10144. <https://doi.org/10.1021/jf401837a>

Conway, V., Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (2013). Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 364-372. <https://doi.org/10.1021/jf304309g>

Coríci, L. N., Frissen, A. E., van Zoelen, D. J., Eggen, I. F., Peter, F., Davidescu, C. M., & Boeriu, C. G. (2011). Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73(1-4), 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.08.004>

Crowley, S. V., Kelly, A. L., Schuck, P., Jeantet, R., & O'mahony, J. A. (2016). Rehydration and solubility characteristics of high-protein dairy powders. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1B: Proteins: Applied Aspects*, 99-131. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2800-2_4)

Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. (2021). Enzymatic hydrolysis and microbial fermentation: The most favorable biotechnological methods for the release of bioactive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 3, 100047. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2021.100047>

Cui, Q., Sun, Y., Zhou, Z., Cheng, J., & Guo, M. (2021). Effects of enzymatic hydrolysis on physicochemical properties and solubility and bitterness of milk protein hydrolysates. *Foods*, 10(10), 2462. <https://doi.org/10.3390/foods10102462>

Czechowska, E., Ranoszek-Soliwoda, K., Tomaszewska, E., Pudlarz, A., Celichowski, G., Gralak-Zwolenik, D., ... & Grobelny, J. (2018). Comparison of the antioxidant activity of catalase immobilized on gold nanoparticles via specific and non-specific adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171, 707-714. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.036>

da Silva Melo, A. E. C., de Sousa, F. S. R., dos Santos-Silva, A. M., do Nascimento, E. G., Fernandes-Pedrosa, M. F., de Medeiros, C. A. C. X., & da Silva-Junior, A. A. (2023). Immobilization of papain in chitosan membranes as a potential alternative for skin wounds. *Pharmaceutics*, 15(12), 2649. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122649>

da Silva, V. G., & de Castro, R. J. S. (2018). Biocatalytic action of proteases in ionic liquids: Improvements on their enzymatic activity, thermal stability and kinetic parameters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.084>

Dai, H., Ou, S., Liu, Z., & Huang, H. (2017). Pineapple peel carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol/mesoporous silica SBA-15 hydrogel composites for papain immobilization. *Carbohydrate polymers*, 169, 504-514. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.057>

Dalla Costa, C. A. (2015). *Rendimiento quesero teórico y real de la leche de la cuenca de Villa María, Córdoba* [Tesis de maestría, Universidad Católica de Córdoba]. Disponible en: [https://pa.bibdigital.ucc.edu.ar/665/1/TM\\_DallaCosta\\_Cesar.pdf](https://pa.bibdigital.ucc.edu.ar/665/1/TM_DallaCosta_Cesar.pdf)

Danielli, C., van Langen, L., Boes, D., Asaro, F., Anselmi, S., Provenza, F., ... & Gardossi, L. (2022). 2, 5-Furandicarboxaldehyde as a bio-based crosslinking agent replacing glutaraldehyde for covalent enzyme immobilization. *RSC Advances*, 12(55), 35676-35684. <https://doi.org/10.1039/D2RA07153C>

Darwesh, O. M., Ali, S. S., Matter, I. A., Elsamahy, T., & Mahmoud, Y. A. (2020). Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications. In *Methods in enzymology* (Vol. 630, pp. 481-502). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.11.006>

de Castro, R. J. S., & Sato, H. H. (2015). Synergistic actions of proteolytic enzymes for production of soy protein hydrolysates with antioxidant activities: an approach based on enzymes specificities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 694-702. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.012>

de Souza, C. F. V., Faccin, D. J. L., Mertins, O., Heck, J. X., da Silveira, N. P., Secchi, A. R., & Ayub, M. A. Z. (2009). Kinetics of thermal inactivation of transglutaminase from a newly isolated *Bacillus circulans* BL32. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 84(10), 1567-1575. <https://doi.org/10.1002/jctb.2201>

del Mar Yust, M., del Carmen Millán-Linares, M., Alcaide-Hidalgo, J. M., Millán, F., & Pedroche, J. (2013). Hydrolysis of chickpea proteins with Flavourzyme immobilized on glyoxyl-agarose gels improves functional properties. *Food Science and Technology International*, 19(3), 217-223. <https://doi.org/10.1177/1082013212442197>

Dong, Y., Yan, W., & Zhang, Y. Q. (2022). Effects of spray drying and freeze drying on physicochemical properties, antioxidant and ace inhibitory activities of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) skin hydrolysates. *Foods*, *11*(14), 2083. <https://doi.org/10.3390/foods11142083>

dos Santos Kimberle, P., Carolina, M. S., Ana, I. S. B., & Luciana, R. B. G. (2020). Modifying alcalase activity and stability by immobilization onto chitosan aiming at the production of bioactive peptides by hydrolysis of tilapia skin gelatin. *Process Biochemistry*, *97*, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.019>

Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F., & Foegeding, E. A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by Alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(21), 6300-6308. <https://doi.org/10.1021/jf026242v>

Dullius, A., Goettert, M. I., & de Souza, C. F. V. (2018). Whey protein hydrolysates as a source of bioactive peptides for functional foods—Biotechnological facilitation of industrial scale-up. *Journal of Functional Foods*, *42*, 58-74. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.12.063>

Eberhardt, A. (2025). *Obtención de un ingrediente bioactivo mediante hidrólisis enzimática de la proteína total del suero lácteo: caracterización funcional y aplicación alimentaria*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Litoral. En internet: <https://hdl.handle.net/11185/8488>

Eberhardt, A., López, E. C., Ceruti, R. J., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2019). Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey protein hydrolysates using Alcalase®. *International Journal of Dairy Technology*, *72*(4), 573-584. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12606>

Eberhardt, A., López, E. C., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2021). Whey protein hydrolysis with microbial proteases: Determination of kinetic parameters and bioactive properties for different reaction conditions. *International Journal of Dairy Technology*, *74*(3), 489-504. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12795>

Eberhardt, A., Mammarella, E. J., Simonetta, A. C., Spontón, P. G., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2017). Evaluación de la presencia de propiedades bioactivas en hidrolizados enzimáticos de proteína de suero lácteo. XVI Congreso de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Buenos Aires, Argentina.

Eberhardt, A., Niizawa, I., López, E., Rossi, Y., Montenegro, M., Mammarella, E., Manzo, R. M., Sihufe, G. (2025). Production of whey protein ingredients with improved

bioactivity based on single and sequential enzymatic hydrolysis reactions. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 5, 101-111. <https://doi.org/10.1007/s43393-024-00318-z>

Establier, R., & Gutiérrez, M. (1978). Efecto de algunos iones metálicos divalentes sobre la actividad proteolítica de las enzimas de la masa visceral del boquerón (*Engraulis encrasicolus* L.). *Investigación Pesquera*, 42(2), 341-348. <http://hdl.handle.net/10261/217418>

Fenoglio, C. L., Sihufe, G. A., Manzo, R., Rubiolo, A. C., & Mammarella, E. J. (2012). Hidrólisis enzimática de proteína de suero de quesería para su utilización en fórmulas hipoalergénicas. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Buzios, Brasil.

Fenoglio, C. L., Sihufe, G. A., Manzo, R., Rubiolo, A. C., & Mammarella, E. J. (2013). Estudio de las condiciones de operación para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de WPC utilizando una combinación de las enzimas alcalasa y carboxipeptidasa A. XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Rosario, Argentina.

Fenoglio, C. L., Vierling, N., Manzo, R. M., Ceruti, R. J., Sihufe, G. A., & Mammarella, E. J. (2016). Whey protein hydrolysis with free and immobilized Alcalase®: Effects of operating parameters on the modulation of peptide profiles obtained. *American Journal of Food Technology*, 11(4), 152-158. <http://dx.doi.org/10.3923/ajft.2016.152.158>

Fernández Rodríguez, C., Martínez Torres, E. J., Morán Palao, A., & Gómez Barrios, X. (2016). Procesos biológicos para el tratamiento de lactosuero con producción de biogás e hidrógeno. Revisión bibliográfica. *Revista Ion*, 29(1), 47-62. <http://dx.doi.org/10.18273/revion.v29n1-2016004>

Fernández, A., & Kelly, P. (2016). pH-stat vs. free-fall pH techniques in the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *Food Chemistry*, 199, 409-415. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.043>

Ferreira, L., Ramos, M. A., Dordick, J. S., & Gil, M. H. (2003). Influence of different silica derivatives in the immobilization and stabilization of a *Bacillus licheniformis* protease (Subtilisin Carlsberg). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21(4-6), 189-199. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00223-0](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00223-0)

Flores, E. E. E., Cardoso, F. D., Siqueira, L. B., Ricardi, N. C., Costa, T. H., Rodrigues, R. C., ... & Hertz, P. F. (2019). Influence of reaction parameters in the polymerization between genipin and chitosan for enzyme immobilization. *Process Biochemistry*, 84, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.001>

Freitas, F. F., Marquez, L. D., Ribeiro, G. P., Brandão, G. C., Cardoso, V. L., & Ribeiro, E. J. (2011). A comparison of the kinetic properties of free and immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. *Biochemical Engineering Journal*, 58, 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.08.011>

Garofulić, I. E., Zorić, Z., Pedisić, S., & Dragović-Uzelac, V. (2016). Optimization of sour cherry juice spray drying as affected by carrier material and temperature. *Food Technology and Biotechnology*, 54(4), 441. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.04.16.4601>

Gelsema, W. J., De Ligny, C. L., Blanken, W. M., Hamer, R. J., Roozen, A. M. P., & Bakker, J. A. (1980). Study of the feasibility of separation of carrier ampholytes from peptides by hydrophobic interaction chromatography on octyl-sepharose. *Journal of Chromatography A*, 196(1), 51-58. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)80358-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)80358-1)

Genta, I., Costantini, M., Asti, A., Conti, B., & Montanari, L. (1998). Influence of glutaraldehyde on drug release and mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *Carbohydrate polymers*, 36(2-3), 81-88. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00022-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00022-8)

Ghaffari-Moghaddam, M., Eslahi, H., Omay, D., & Zakipour-Rahimabadi, E. (2014). Industrial applications of enzymes. *Review Journal of Chemistry*, 4, 341-361. <https://doi.org/10.1134/S2079978014040037>

Giulianetti de Almeida, M. P., Mockaitis, G., & Weissbrodt, D. G. (2023). Got whey? Sustainability endpoints for the dairy industry through resource biorecovery. *Fermentation*, 9(10), 897. <https://doi.org/10.3390/fermentation9100897>

Gohel, S. D., & Singh, S. P. (2012). Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardiosis alba* OK-5. *Journal of Chromatography B*, 889, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.031>

Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M. P., González-Tello, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79-89. <http://hdl.handle.net/10481/28336>

Guisan, J. M. (Ed.) (2013). *Immobilization of enzymes and cells* (3rd ed., Vol. 1051). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_1)

Gummadi, S. N. (2003). What is the role of thermodynamics on protein stability?. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(1), 9-18. <https://doi.org/10.1007/BF02932892>

Hammond, S. (2025). The importance of moisture control in powder processing. *Processing*. Recuperado de: <https://www.proquest.com/openview/237b6c29c311b2b42d57b6354536c65c/1?pq-origsite=gscholar&cbl=7215281>

Hansupalak, N., Kitsongsermthon, P., & Jiratananon, R. (2010). Immobilized Flavourzyme on chitosan beads for seasoning sauce production: Covalent binding vs entrapment. In M. Ueda & T. Serizawa (Eds.), *Contemporary science of polymeric materials: A symposium in honor of Professor Frank E. Karasz on the occasion of his 75th birthday* (ACS Symposium Series, Vol. 1061, pp.53-62). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2010-1061.ch004>

Hayakari, M., Kondo, Y., & Izumi, H. (1978). A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme. *Analytical Biochemistry*, 84(2), 361-369. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90053-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90053-2)

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>

Hernández-Martínez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Bergmann, C. W., Loera-Corral, O., Rojo-Domínguez, A., Huerta-Ochoa, S., ... & Prado-Barragán, L. A. (2011). Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*, 46(10), 2001-2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.013>

Hidayanti, F., & Harnovan, A. A. (2020). Application of scanning electron microscopy: a review. *International Journal of Applied Science and Engineering Review*, 1(6), 91-102. Recuperado de [https://www.ijaser.org/uploads/ijaser\\_01\\_35.pdf](https://www.ijaser.org/uploads/ijaser_01_35.pdf)

Hippauf, F., Lunow, D., Borchardt, L., Henle, T., & Kaskel, S. (2014). Extraction of ACE-inhibiting dipeptides from protein hydrolysates using porous carbon materials. *Carbon*, 77, 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.05.021>

Hong, J., Xu, D., Gong, P., Yu, J., Ma, H., & Yao, S. (2008). Covalent-bonded immobilization of enzyme on hydrophilic polymer covering magnetic nanogels. *Microporous and mesoporous materials*, 109(1-3), 470-477. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.05.052>

Hussain, F., Arana-Peña, S., Morellon-Sterling, R., Barbosa, O., Ait Braham, S., Kamal, S., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Further stabilization of Alcalase immobilized on glyoxyl supports: Amination plus modification with glutaraldehyde. *Molecules*, 23(12), 3188. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23123188>

Hussain, R., Gaiani, C., Jeandel, C., Ghanbaja, J., & Scher, J. (2012). Combined effect of heat treatment and ionic strength on the functionality of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6260-6273. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5416>

Huu, C. X., Linh, N. B., Yen, N. T. H., & Long, D. D. (2014). Immobilizing alcalase R. *Communications in Physics*, 24(3S1), 121-126. <http://dx.doi.org/10.15625/0868-3166/24/3S1/5464>

Ibrahim, H. R., Ahmed, A. S., & Miyata, T. (2017). Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from caseins and whey proteins of goat milk. *Journal of Advanced Research*, 8(1), 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2016.12.002>

Illanes, A., Cauherff, A., Wilson, L., & Castro, G. R. (2012). Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*, 115, 48-57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.050>

Imam, H. T., Marr, P. C., & Marr, A. C. (2021). Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. *Green Chemistry*, 23(14), 4980-5005. <https://doi.org/10.1039/D1GC01852C>

Islam, M. I. U., Edrisi, M., & Langrish, T. (2013). Improving process yield by adding WPI to lactose during crystallization and spray drying under high-humidity conditions. *Drying Technology*, 31(4), 393-404. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.737396>

Jemli, S., Ayadi-Zouari, D., Hlima, H. B., & Bejar, S. (2016). Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 246-258. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.950550>

Jiang, B., Zhang, X., Yuan, Y., Qu, Y., & Feng, Z. (2017). Separation of antioxidant peptides from pepsin hydrolysate of whey protein isolate by ATPS of EOPO co-polymer (UCON)/phosphate. *Scientific Reports*, 7(1), 13320. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13507-9>

Jrad, Z., El Hatmi, H., Adt, I., Girardet, J. M., Cakir-Kiefer, C., Jardin, J., ... & Oulahal, N. (2014). Effect of digestive enzymes on antimicrobial, radical scavenging and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of camel colostrum and milk proteins. *Dairy Science & Technology*, 94, 205-224. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0154-1>

Kaçoğlu, H. S., Ceylan, Ö., & Çelebi, M. (2024). Swelling and re-swelling performance of glutaraldehyde crosslinked wet chitosan hydrogels. *Journal of Innovative Engineering and Natural Science*, 5(1), 30-43. <https://doi.org/10.61112/jiens.1484566>

Kamaldeep, K. (2023). *Covalent immobilization of bacterial alkaline protease and its application in poultry feed* [Tesis de maestría, Universidad Agrícola CCS Haryana]. Disponible en: <https://krishikosh.egranth.ac.in/handle/1/5810206426>

Karam, E. A., Wahab, W. A. A., Saleh, S. A., Hassan, M. E., Kansoh, A. L., & Esawy, M. A. (2017). Production, immobilization and thermodynamic studies of free and immobilized *Aspergillus awamori* amylase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 694-703. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.033>

Khan, M. R. (2021). Immobilized enzymes: a comprehensive review. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00649-0>

Kleekayai, T., O'Neill, A., Clarke, S., Holmes, N., O'Sullivan, B., & FitzGerald, R. J. (2022). Contribution of hydrolysis and drying conditions to whey protein hydrolysate characteristics and in vitro antioxidative properties. *Antioxidants*, 11(2), 399. <https://doi.org/10.3390/antiox11020399>

Kleekayai, T., O'Neill, A., Clarke, S., Holmes, N., O'Sullivan, B., & FitzGerald, R. J. (2022). Contribution of hydrolysis and drying conditions to whey protein hydrolysate characteristics and in vitro antioxidative properties. *Antioxidants*, 11(2), 399. <https://doi.org/10.3390/antiox11020399>

Kobayashi, Y., Yamauchi, T., Katsuda, T., Yamaji, H., & Katoh, S. (2008). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory mechanism of tripeptides containing aromatic residues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(3), 310-312. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.310>

Kougoulos, E., Marziano, I., & Miller, P. R. (2010). Lactose particle engineering: Influence of ultrasound and anti-solvent on crystal habit and particle size. *Journal of Crystal Growth*, 312(23), 3509-3520. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2010.09.022>

Kristoffersen, K. A., Afseth, N. K., Böcker, U., Lindberg, D., de Vogel-van den Bosch, H., Ruud, M. L., & Wubshet, S. G. (2020). Average molecular weight, degree of hydrolysis and dry-film FTIR fingerprint of milk protein hydrolysates: Intercorrelation and application in process monitoring. *Food Chemistry*, 310, 125800. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125800>

Kruchinin, A., Barkovskaya, I., Illarionova, E., Bolshakova, E., Turovskaya, S., & Galstyan, A. (2025). Effect of enzymatic degradation of proteins on technological properties of whey powdered products. *International Journal of Dairy Technology*, 78(2), e70005. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.70005>

Kujawa, J., Głodek, M., Li, G., Al-Gharabli, S., Knozowska, K., & Kujawski, W. (2021). Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. *Science of The Total Environment*, 801, 149647. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149647>

Kumar, A. G., Swarnalatha, S., Kamatchi, P., & Sekaran, G. (2009). Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. *Biochemical Engineering Journal*, 43(2), 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.09.017>

Kumar, D., Chatli, M. K., Singh, R., Mehta, N., & Kumar, P. (2016). Enzymatic hydrolysis of camel milk casein and its antioxidant properties. *Dairy Science & Technology*, 96(3), 391-404. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0275-9>

Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General properties. *Journal of General Physiology*, 30(4), 291-310. <https://doi.org/10.1085/jgp.30.4.291>

Lavari, L., Páez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2014). Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. *Journal of Dairy Research*, 81(3), 267-274. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000156>

Leong, Y. K., & Chang, J. S. (2024). Proteins and bioactive peptides from algae: Insights into antioxidant, anti-hypertensive, anti-diabetic and anti-cancer activities. *Trends in Food Science & Technology*, 104352. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104352>

Leskovac, V. (2003). Cooperative and allosteric effects. In *Comprehensive enzyme kinetics* (pp. 243-282). Springer. [https://doi.org/10.1007/0-306-48390-4\\_13](https://doi.org/10.1007/0-306-48390-4_13)

Levitsky, V. Y., Melik-Nubarov, N. S., Siksnis, V. A., Grinberg, V. Y., Burova, T. V., Levashov, A. V., & Mozhaev, V. V. (1994). Reversible conformational transition gives rise to 'zig-zag' temperature dependence of the rate constant of irreversible thermoinactivation of enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 219(1-2), 219-230. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb19933.x>

Li, B., Shan, C. L., Zhou, Q., Fang, Y., Wang, Y. L., Xu, F., ... & Sun, G. C. (2013). Synthesis, characterization, and antibacterial activity of cross-linked chitosan-glutaraldehyde. *Marine drugs*, 11(5), 1534-1552. <https://doi.org/10.3390/md11051534>

Li, H., Gao, J. A., Zhao, F., Liu, X., & Ma, B. (2023). Bioactive peptides from edible mushrooms—the preparation, mechanisms, structure—activity relationships and prospects. *Foods*, 12(15), 2935. <https://doi.org/10.3390/foods12152935>

Li, Z., Wang, J., Zheng, B., & Guo, Z. (2020). Impact of combined ultrasound-microwave treatment on structural and functional properties of golden threadfin bream (*Nemipterus virgatus*) myofibrillar proteins and hydrolysates. *Ultrasonics Sonochemistry*, 65, 105063. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105063>

Liang, X., Qian, G., Sun, J., Yang, M., Shi, X., Yang, H., ... & Yue, X. (2021). Evaluation of antigenicity and nutritional properties of enzymatically hydrolyzed cow milk. *Scientific Reports*, 11(1), 18623. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98136-z>

Liao, J., & Huang, H. (2019). Green magnetic hydrogels synthesis, characterization and flavourzyme immobilization based on chitin from *Hericium erinaceus* residue and polyvinyl alcohol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 462-472. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.038>

Liese, A., Seelbach, K., & Wandrey, C. (2000). *Industrial Biotransformations*. Wiley-VCH. <https://www.wiley-vch.de/en/areas-interest/natural-sciences/industrial-biotransformations-978-3-527-30094-5>

Liu, C., Liu, W., Feng, Z., & Li, D. (2014). Aggregation of whey protein hydrolysate using alcalase 2.4 L. *Plos one*, 9(10), e109439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109439>

Liu, S., Li, Z., Yu, B., Wang, S., Shen, Y., & Cong, H. (2020). Recent advances on protein separation and purification methods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 284, 102254. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102254>

Liu, Z., Li, D., Dai, H., & Huang, H. (2017). Preparation and characterization of papain embedded in magnetic cellulose hydrogels prepared from tea residue. *Journal of Molecular Liquids*, 232, 449-456. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.02.100>

Lopes, L. A., Novelli, P. K., Fernandez-Lafuente, R., Tardioli, P. W., & Giordano, R. L. C. (2020). Glyoxyl-activated agarose as support for covalently link Novo-Pro D: Biocatalysts performance in the hydrolysis of casein. *Catalysts*, 10(5), 466. <https://doi.org/10.3390/catal10050466>

López-Pedrouso, M., Zaky, A. A., Lorenzo, J. M., Camiña, M., & Franco, D. (2023). A review on bioactive peptides derived from meat and by-products: Extraction methods, biological activities, applications and limitations. *Meat Science*, 204, 109278. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109278>

Luo, H., Zhao, H., Chang, Y., Wang, Q., Yu, H., & Shen, Z. (2015). Oriented immobilization and characterization of a poly-lysine-tagged cephalosporin C acylase on glyoxyl

agarose support. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175, 2114-2123.  
<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1411-3>

Luparelli, A., Trisciuzzi, D., Schirinzi, W. M., Caputo, L., Smiriglia, L., Quintieri, L., ... & Monaci, L. (2025). Whey Proteins and Bioactive Peptides: Advances in Production, Selection and Bioactivity Profiling. *Biomedicines*, 13(6), 1311.  
<https://doi.org/10.3390/biomedicines13061311>

Lv, C., Gu, T., Ma, R., Yao, W., Huang, Y., Gu, J., & Zhao, G. (2021). Biochemical characterization of a GH19 chitinase from *Streptomyces alfalfae* and its applications in crystalline chitin conversion and biocontrol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.178>

Ma, Y., Liu, J., Shi, H., & Yu, L. L. (2016). Isolation and characterization of anti-inflammatory peptides derived from whey protein. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 6902-6912.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11186>

Madadlou, A., Iacopino, D., Sheehan, D., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, M. E. (2010). Enhanced thermal and ultrasonic stability of a fungal protease encapsulated within biomimetically generated silicate nanospheres. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1800(4), 459-465. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.01.004>

Magalhães, I. S., Guimarães, A. D. B., Tribst, A. A. L., de Oliveira, E. B., & Júnior, B. R. D. C. L. (2022). Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of goat milk casein: Effects on hydrolysis kinetics and on the solubility and antioxidant activity of hydrolysates. *Food Research International*, 157, 111310. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111310>

Måge, I., Böcker, U., Wubshet, S. G., Lindberg, D., & Afseth, N. K. (2021). Fourier-transform infrared (FTIR) fingerprinting for quality assessment of protein hydrolysates. *Lwt*, 152, 112339. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112339>

Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., & Azzazy, H. M. E. S. (2023). Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, 8(6), 5184-5196.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>

Mahgoub, S., Alagawany, M., Nader, M., Omar, S. M., Abd El-Hack, M. E., Swelum, A., ... & Dhama, K. (2023). Recent development in bioactive peptides from plant and animal products and their impact on the human health. *Food Reviews International*, 39(1), 511-536.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>

Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., & Athira, S. (2015). Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3235-3241. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1361-3>

Mannheim, A., & Cheryan, M. (1990). Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. *Journal of Food Science*, 55(2), 381-385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1990.tb06769.x>

Manzo, R. M. (2013). *Preparación y caracterización de derivados insolubilizados de la enzima L-arabinosa isomerasa para su empleo en la bioconversión de D-galactosa en D-tagatosa* (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral. En internet: <http://hdl.handle.net/11185/446>

Manzo, R. M., Ceruti, R. J., Bonazza, H. L., Adriano, W. S., Sihufe, G. A., & Mammarella, E. J. (2018). Immobilization of carboxypeptidase A into modified chitosan matrixes by covalent attachment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185, 1029-1043. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2708-4>

Manzo, R. M., de Sousa, M., Fenoglio, C. L., Gonçalves, L. R. B., & Mammarella, E. J. (2015). Chemical improvement of chitosan-modified beads for the immobilization of *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 l-arabinose isomerase through multipoint covalent attachment approach. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(10), 1325-1340. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1662-1>

Martínez-Montañó, E., Sarmiento-Machado, R. M., Osuna-Ruíz, I., Benítez-García, I., Pacheco-Aguilar, R., Navarro-Peraza, R. S., Lugo Sánchez, M. E., Valdez-Ortiz, Á., Germán Báez, L. J., Bañuelos-Vargas, I., Rodríguez-Tirado, V. A., & Salazar-Leyva, J. A. (2022). Effect of degree of hydrolysis on biochemical properties and biological activities (antioxidant and antihypertensive) of protein hydrolysates from pacific thread herring (*Ophistonema libertate*) stickwater. *Waste and Biomass Valorization*, 13(2), 1015-1027. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01590-z>

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>

Mechri, S., Berrouina, M. B. E., Benmradi, M. O., Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Moujehed, E., ... & Jaouadi, B. (2017). Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 221-232. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.112>

Memon, A. H., Ding, R., Yuan, Q., Wei, Y., & Liang, H. (2019). Facile synthesis of alcalase-inorganic hybrid nanoflowers used for soy protein isolate hydrolysis to improve its functional properties. *Food Chemistry*, 289, 568-574. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.096>

Meneau Hernández, R. I. M., Morales, K. B., Garrido, M. L., & Piñera, T. F. (2021). Inmovilización una mirada a los métodos, soportes y retos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 52(1), 59-78. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rccb/v52n1/2221-2450-rccb-52-01-59.pdf>

Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., ... & Fischer, L. (2015b). Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(23), 5682-5693. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01665>

Merz, M., Eisele, T., Claßen, W., Appel, D., Rabe, S., Stressler, T., & Fischer, L. (2015a). Continuous long-term hydrolysis of wheat gluten using a principally food-grade enzyme membrane reactor system. *Biochemical Engineering Journal*, 99, 114-123. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.03.019>

Merz, M., Ewert, J., Baur, C., Appel, D., Blank, I., Stressler, T., & Fischer, L. (2015c). Wheat gluten hydrolysis using isolated Flavourzyme peptidases: Product inhibition and determination of synergistic effects using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.010>

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004b). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*, 37(5), 790-802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>

Migneault, I., Dartiguenave, C., Vinh, J., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004a). Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*, 25(9), 1367-1378. <https://doi.org/10.1002/elps.200305861>

Minj, S., Anand, S., & Martinez-Monteagudo, S. (2021). Evaluating the effect of conjugation on the bioactivities of whey protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 86(12), 5107-5119. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15958>

Monteiro Jr, O. A., & Aioldi, C. (1999). Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological macromolecules*, 26(2-3), 119-128. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(99\)00068-9](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(99)00068-9)

Mudgil, P., AlMazroui, M., Redha, A. A., Kilari, B. P., Srikumar, S., & Maqsood, S. (2022). Cow and camel milk-derived whey and casein protein hydrolysates demonstrated effective antifungal properties against selected *Candida* species. *Journal of Dairy Science*, *105*(3), 1878-1888. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20944>

Muley, A. B., Pandit, A. B., Singhal, R. S., & Dalvi, S. G. (2021). Production of biologically active peptides by hydrolysis of whey protein isolates using hydrodynamic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, *71*, 105385. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105385>

Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1997). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *International Dairy Journal*, *7*(5), 299-303. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(97\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(97)00018-6)

Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., & Kilara, A. (1996). Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science*, *61*(2), 270-275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14174.x>

Naik, L., Mann, B., Bajaj, R., Sangwan, R. B., & Sharma, R. (2013). Process optimization for the production of bio-functional whey protein hydrolysates: Adopting response surface methodology. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, *19*, 231-237. <https://10.1007/s10989-012-9340-x>

Najavand, S., Habibnejad, M., Amani-Ghadim, A. R., Rahimizadeh, P., & Pazhang, M. (2020). Optimized immobilization of endoglucanase Cel9A onto glutaraldehyde activated chitosan nanoparticles by response surface methodology: The study of kinetic behaviors. *Biotechnology Progress*, *36*(3), e2960. <https://doi.org/10.1002/btpr.2960>

Nelson, J. & Griffin, E. G. (1916) Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, *38*(5), 1109-1115. <https://doi.org/10.1021/ja02262a018>

Nielsen, S. D. H., Liang, N., Rathish, H., Kim, B. J., Lueangsakulthai, J., Koh, J., ... & Dallas, D. C. (2023). Bioactive milk peptides: an updated comprehensive overview and database. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *64*(31), 11510-11529. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2240396>

Nisha, S., Karthick, S. A., & Gobi, N. (2012). A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review Letters*, *1*(3), 148-155.

O'Loughlin, I. B., Kelly, P. M., Murray, B. A., FitzGerald, R. J., & Brodtkorb, A. (2015). Molecular characterization of whey protein hydrolysate fractions with ferrous chelating and

enhanced iron solubility capabilities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2708-2714. <https://doi.org/10.1021/jf505817a>

Okagu, I. U., Ezeorba, T. P., Aham, E. C., Aguchem, R. N., & Nechi, R. N. (2022). Recent findings on the cellular and molecular mechanisms of action of novel food-derived antihypertensive peptides. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 4, 100078. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100078>

O'Keeffe, M. B., Conesa, C., & FitzGerald, R. J. (2017). Identification of angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant peptides in a whey protein concentrate hydrolysate produced at semi-pilot scale. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(8), 1751-1759. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13448>

Ortega, N., De Diego, S., Rodríguez-Nogales, J. M., Perez-Mateos, M., & Busto, M. D. (2004). Kinetic behaviour and thermal inactivation of pectinlyase used in food processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(6), 631-639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00822.x>

Osman, A., Goda, H. A., Abdel-Hamid, M., Badran, S. M., & Otte, J. (2016). Antibacterial peptides generated by Alcalase hydrolysis of goat whey. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 480-486. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.043>

Pal, A., & Khanum, F. (2011). Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: characterization of immobilized enzyme. *Process Biochemistry*, 46(6), 1315-1322. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.024>

Pan, D., Cao, J., Guo, H., & Zhao, B. (2012). Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 130(1), 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.011>

Pan, J., Zhang, Z., Mintah, B. K., Xu, H., Dabbour, M., Cheng, Y., ... & Ma, H. (2022). Effects of nonthermal physical processing technologies on functional, structural properties and digestibility of food protein: A review. *Journal of Food Process Engineering*, 45(4), e14010. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14010>

Pang, L., Zhang, W., Chen, C., Li, R., Huang, Z., Liu, S., ... & Jiang, Y. (2024). Effect of enzymatic hydrolysis and ultrasound pretreatment on allergenicity, functional properties and bioactivity of whey protein isolates. *LWT*, 210, 116891. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116891>

Parra Huertas, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4967-4982.

Patil, P. J., Usman, M., Zhang, C., Mehmood, A., Zhou, M., Teng, C., & Li, X. (2022). An updated review on food-derived bioactive peptides: Focus on the regulatory requirements, safety, and bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(2), 1732-1776. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12911>

Pavoni, J. M. F., dos Santos, N. Z., May, I. C., Pollo, L. D., & Tessaro, I. C. (2021). Impact of acid type and glutaraldehyde crosslinking in the physicochemical and mechanical properties and biodegradability of chitosan films. *Polymer Bulletin*, 78, 981-1000. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03140-4>

Peighambaroust, S. H., Karami, Z., Pateiro, M., & Lorenzo, J. M. (2021). A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications. *Biomolecules*, 11(5), 631. <https://doi.org/10.3390/biom11050631>

Pellicer, J. A., Fortea, M. I., Trabal, J., Rodríguez-López, M. I., Gabaldón, J. A., & Núñez-Delicado, E. (2019). Stability of microencapsulated strawberry flavour by spray drying, freeze drying and fluid bed. *Powder Technology*, 347, 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.03.010>

Pereira, E. B., De Castro, H. F., De Moraes, F. F., & Zanin, G. M. (2001). Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*: A comparative study between free and immobilized enzyme onto porous chitosan beads. In B. H. Davison, J. McMillan, & M. Finkelstein (Eds.), *Twenty-second symposium on biotechnology for fuels and chemicals* (pp. 739-752). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/abab:91-93:1-9:739>

Pessato, T. B., de Carvalho, N. C., Tavano, O. L., Fernandes, L. G. R., Zollner, R. D. L., & Netto, F. M. (2016). Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. *Food Research International*, 83, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.02.015>

Pillai, A. T., Morya, S., & Kasankala, L. M. (2024). Emerging trends in bioavailability and pharma-nutraceutical potential of whey bioactives. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2024(1), 8455666. <https://doi.org/10.1155/2024/8455666>

Polakovič, M., & Vrabel, P. (1996). Analysis of the mechanism and kinetics of thermal inactivation of enzymes: Critical assessment of isothermal inactivation experiments. *Process Biochemistry*, 31(8), 787-800. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00026-X)

Poulsen, N. A., Eskildsen, C. E., Akkerman, M., Johansen, L. B., Hansen, M. S., Hansen, P. W., ... & Larsen, L. B. (2016). Predicting hydrolysis of whey protein by mid-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 61, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.04.002>

Purohit, K., Reddy, N., & Sunna, A. (2024). Exploring the potential of bioactive peptides: From natural sources to therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1391. <https://doi.org/10.3390/ijms25031391>

Qualls, R. G., Flynn, M. P., & Johnson, J. D. (1983). The role of suspended particles in ultraviolet disinfection. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 55(10), 1280-1285. <https://www.jstor.org/stable/25042084>

Rafiee, F., & Rezaee, M. (2021). Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 179, 170-195. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.198>

Raju, L., AR, S. C. L., Prakash, N. U., & Rajkumar, E. (2021). Chitosan-terephthaldehyde hydrogels—effect of concentration of cross-linker on structural, swelling, thermal and antimicrobial properties. *Materialia*, 16, 101082. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2021.101082>

Ramakrishnan, S. R., Jeong, C. R., Park, J. W., Cho, S. S., & Kim, S. J. (2023). A review on the processing of functional proteins or peptides derived from fish by-products and their industrial applications. *Heliyon*, 9(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14188>

Ramalho, E. X., & de Castro, R. J. S. (2023). Covalent bonding immobilization of a *Bacillus licheniformis* protease on chitosan and its application in protein hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 50, 102713. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102713>

Rao, Q., Klaassen Kamdar, A., & Labuza, T. P. (2016). Storage stability of food protein hydrolysates—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1169-1192. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.758085>

Rasband, WS, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij>. 1997-2025.

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)

Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., & Askari, G. (2020). Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology*, 38(1-2), 235-258. <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906>

Rha, C. S., Lee, D. H., Kim, S. G., Min, W. K., Byun, S. G., Kweon, D. H., ... & Seo, J. H. (2005). Production of cyclodextrin by poly-lysine fused *Bacillus macerans* cyclodextrin glycosyltransferase immobilized on cation exchanger. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 34(1-6), 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.04.004>

Robescu, M. S., & Bavaro, T. (2025). A comprehensive guide to enzyme immobilization: all you need to know. *Molecules*, 30(4), 939. <https://doi.org/10.3390/molecules30040939>

Rocha, G. F., Kise, F., Rosso, A. M., & Parisi, M. G. (2017). Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits. *Food Chemistry*, 237, 350-355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.112>

Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., & Fernandez-Lafuente, R. (2021). Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. *Biotechnology Advances*, 52, 107821. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107821>

Rodriguez-Nogales, J. M., & Delgadillo, A. (2005). Stability and catalytic kinetics of microencapsulated  $\beta$ -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration–rehydration method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 33(1-2), 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.01.003>

Romero-Fernández, M., & Paradisi, F. (2020). General overview on immobilization techniques of enzymes for biocatalysis. In S. M. Dias & C. A. M. Afonso (Eds.), *Catalyst Immobilization: Methods and applications*, (pp. 409-435). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527817290.ch12>

Rukluarh, S., Kanjanapongkul, K., Panchan, N., & Niumnuy, C. (2019). Effect of inclusion conditions on characteristics of spray dried whey protein hydrolysate/ $\gamma$ -cyclodextrin complexes. *Journal of Food Science and Agricultural Technology (JFAT)*, 5, 5-12. Recuperado en: <http://rs.mfu.ac.th/ojs/index.php/jfat/article/viewFile/228/150>

Ryan, G., O'Regan, J., & FitzGerald, R. J. (2022). Rehydration and water sorption behaviour of bovine milk protein isolate and its associated enzymatic hydrolysates. *International Dairy Journal*, 128, 105323. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105323>

Ryan, M. P., & Walsh, G. (2016). The biotechnological potential of whey. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 15, 479-498. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9402-1>

Saadatkhah, N., Carillo Garcia, A., Ackermann, S., Leclerc, P., Latifi, M., Samih, S., ... & Chaouki, J. (2020). Experimental methods in chemical engineering: Thermogravimetric analysis—TGA. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 98(1), 34-43. <https://doi.org/10.1002/cjce.23673>

Sadana, A., & Henley, J. P. (1987). Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 30(6), 717-723. <https://doi.org/10.1002/bit.260300604>

Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. (2018). Antioxidative and antibacterial peptides derived from bovine milk proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(5), 726-740. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1217825>

Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., & Imayasu, S. (1994). Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(10), 1767-1771. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.1767>

Sattar, H., Aman, A., & Qader, S. A. U. (2017). Effect of metal ions, solvents and surfactants on the activity of protease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 13, 491-495. <https://doi.org/10.6000/1927-5129.2017.13.80>

Sayem, S. A., Alam, M. J., & Hoq, M. M. (2006). Effect of temperature, pH and metal ions on the activity and stability of alkaline protease from novel *Bacillus licheniformis* MZK03. *Proceedings-Pakistan Academy of Sciences*, 43(4), 257.

Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., Van Rantwijk, F., ... & Sheldon, R. A. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, 87(6), 754-762. <https://doi.org/10.1002/bit.20184>

Schröder, A., Berton-Carabin, C., Venema, P., & Cornacchia, L. (2017). Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 73, 129-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.06.001>

Seo, C. W. (2022). Improved flowability and wettability of whey protein-fortified skim milk powder via fluidized bed agglomeration. *Food Science of Animal Resources*, 42(6), 915. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2022.e47>

Sheldon, R. A. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA® s): Stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1583-1587. <https://doi.org/10.1042/BST0351583>

Sheldon, R. A., & Woodley, J. M. (2018). Role of biocatalysis in sustainable chemistry. *Chemical Reviews*, 118(2), 801-838. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00203>

Shuai, X., Gao, L., Geng, Q., Li, T., He, X., Chen, J., ... & Dai, T. (2022). Effects of moderate enzymatic hydrolysis on structure and functional properties of pea protein. *Foods*, 11(15), 2368. <https://doi.org/10.3390/foods11152368>

Silva, M. B. P. D. O., Abdal, D., Prado, J. P. Z., Dias, G. D. S., Morales, S. A. V., Xavier, M. D. C. A., ... & Perna, R. F. (2021). Effect of temperature, pH and storage time on the stability of an extracellular fructosyltransferase from *Aspergillus oryzae* IPT-301. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24, e2020283. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.28320>

Silva, S. V., Pihlanto, A., & Malcata, F. X. (2006). Bioactive peptides in ovine and caprine cheeselike systems prepared with proteases from *Cynara cardunculus*. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3336-3344. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72370-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72370-0)

Sinha, R., Radha, C., Prakash, J., & Kaul, P. (2007). Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. *Food chemistry*, 101(4), 1484-1491. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.021>

Soladoye, O. P., Saldo, J., Peiro, L., Rovira, A., & Mor-Mur, M. (2015). Antioxidant and angiotensin 1 converting enzyme inhibitory functions from chicken collagen hydrolysates. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 5(3), 1. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9600.1000369>

Song, L., Chen, Y., Liu, H., & Zhang, X. (2024). Preparation, biological activities, and potential applications of hen egg-derived peptides: A review. *Foods*, 13(6), 885. <https://doi.org/10.3390/foods13060885>

Striegel, A. M., Yau, W. W., Kirkland, J. J., & Bly, D. D. (2009). *Modern size-exclusion liquid chromatography: Practice of gel permeation and gel filtration chromatography* (2nd ed.). John Wiley & Sons.

Syll, O., Khalloufi, S., Mejean, S., & Schuck, P. (2016). The effects of total protein/total solid ratio and pH on the spray drying process and rehydration properties of soy powder. *Powder Technology*, 289, 60-64. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.11.049>

Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, A., & 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>

Taha, F. S., & Ibrahim, M. A. (2002). Effect of degree of hydrolysis on the functional properties of some oilseed proteins. *Grasas y Aceites*, *53*(3), 273-281. <https://doi.org/10.3989/gya.2002.v53.i3.317>

Tang, S., Zhou, X., Gouda, M., Cai, Z., & Jin, Y. (2019). Effect of enzymatic hydrolysis on the solubility of egg yolk powder from the changes in structure and functional properties. *Lwt*, *110*, 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.070>

Tang, W. L., Zhang, M., Adhikari, B., & Mujumdar, A. S. (2013). Effects of preparation and drying methods on the antioxidant activity of enzymatically hydrolyzed porcine placenta hydrolysates. *Drying Technology*, *31*(13-14), 1600-1610. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.808660>

Tardioli, P. W., Pedroche, J., Giordano, R. L., Fernández-Lafuente, R., & Guisan, J. M. (2003). Hydrolysis of proteins by immobilized-stabilized alcalase-glyoxyl agarose. *Biotechnology progress*, *19*(2), 352-360. <https://doi.org/10.1021/bp025588n>

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>

Tavares, T., del Mar Contreras, M., Amorim, M., Pintado, M., Recio, I., & Malcata, F. X. (2011). Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes. *Peptides*, *32*(5), 1013-1019. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.02.005>

Teixeira, C. S., Villa, C., Costa, J., Ferreira, I. M., & Mafra, I. (2023). Edible insects as a novel source of bioactive peptides: A systematic review. *Foods*, *12*(10), 2026. <https://doi.org/10.3390/foods12102026>

Tejedor, M. B., Pazesh, S., Nordgren, N., Schuleit, M., Rutland, M. W., Alderborn, G., & Millqvist-Fureby, A. (2018). Milling induced amorphisation and recrystallization of  $\alpha$ -lactose monohydrate. *International Journal of Pharmaceutics*, *537*(1-2), 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.021>

Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F. C., Nasr, K. A., ... & Zhou, S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*, 61, 579-601. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00187-1>

Tomazic, S. J., & Klibanov, A. M. (1988). Mechanisms of irreversible thermal inactivation of *Bacillus alpha-amylases*. *Journal of Biological Chemistry*, 263(7), 3086-3091. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)69038-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)69038-6)

Tondo, A. R., Caputo, L., Mangiatordi, G. F., Monaci, L., Lentini, G., Logrieco, A. F., ... & Quintieri, L. (2019). Structure-based identification and design of angiotensin converting enzyme-inhibitory peptides from whey proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(2), 541-548. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06237>

Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>

Torğut, G., Yazdıç, F. C., & Gürler, N. (2022). Synthesis, characterization, pH-sensitive swelling and antimicrobial activities of chitosan-graft-poly (hydroxyethyl methacrylate) hydrogel composites for biomedical applications. *Polymer Engineering & Science*, 62(8), 2552-2559. <https://doi.org/10.1002/pen.26040>

Uluko, H., Liu, L., Li, H., Cui, W., Zhang, S., Zhao, L., ... & Lv, J. (2014). Effect of power ultrasound pretreatment on peptidic profiles and angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12). <https://doi.org/10.1002/jsfa.6572>

Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 18, 1138-1146. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.11.024>

Vafabakhsh, Z., Khosravi-Darani, K., Khajeh, K., Jahadi, M., Komeili, R., & Mortazavian, A. M. (2013). Stability and catalytic kinetics of protease loaded liposomes. *Biochemical Engineering Journal*, 72, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.11.018>

Valencia, P., Bustos, N., & Almonacid, S. (2011, May). Modulation of thermal inactivation of protease during enzymatic hydrolysis of salmon muscle. In *11th International Congress On Engineering and Food* (MFS1086, pp. 22–26). Athens, Greece.

Van Der Ven, C., Muresan, S., Gruppen, H., De Bont, D. B., Merck, K. B., & Voragen, A. G. (2002). FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 6943-6950. <https://doi.org/10.1021/jf020387k>

Vaze, R. G., Odaneth, A. A., & Lali, A. M. (2017). Controlled protein hydrolysis with immobilized alkaline endo protease. *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering*, 2, 28-40. <http://dx.doi.org/10.15406/jabb.2017.02.00028>

Veldre, K., Actiņš, A., & Eglīte, Z. (2011). Flecainide acetate acetic acid solvates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(2), 604-611. <https://doi.org/10.1002/jps.22295>

Ventimiglia, L. A., Torrens Baudrix, L., Arzuaga, E., & Urtasun, E. (2021). Prueba exploratoria de un derivado de la leche en agricultura extensiva. [Informe técnico]. AER 9 de Julio, INTA. <http://hdl.handle.net/20.500.12123/9068>

Verma, M. L., Kumar, S., Das, A., Randhawa, J. S., & Chamundeeswari, M. (2020). Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 315-323. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00942-5>

Vierling, N. E., Mammarella, E. J., De Piante Vicín, D. A., & Sihufe, G. A. (2015). Estudio de los perfiles peptídicos y de la capacidad de espumado de hidrolizados enzimáticos de proteína de suero lácteo. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Buenos Aires, Argentina.

Voswinkel, L., & Kulozik, U. (2011). Fractionation of whey proteins by means of membrane adsorption chromatography. *Procedia Food Science*, 1, 900-907. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.136>

Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F., & Ghoshal, S. K. (2020). On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. *Reactive and Functional Polymers*, 152, 104613. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613>

Wahba, M. I. (2022). Gum tragacanth for immobilization of *Bacillus licheniformis* protease: optimization, thermodynamics and application. *Reactive and Functional Polymers*, 179, 105366. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2022.105366>

Walker, J. M. (2002). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. In J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (pp. 11-14). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1592591698>

Walstra, P. (2003). Proteins. In *Physical Chemistry of Foods* (pp. 203–249). Marcel Dekker Inc.

Wang, J., & Zhuang, S. (2022). Chitosan-based materials: Preparation, modification and application. *Journal of Cleaner Production*, 355, 131825. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131825>

Wang, S. N., Zhang, C. R., Qi, B. K., Sui, X. N., Jiang, L. Z., Li, Y., ... & Zhang, Q. Z. (2014). Immobilized alcalase alkaline protease on the magnetic chitosan nanoparticles used for soy protein isolate hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 239(6), 1051-1059. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2301-1>

Wang, W., & Roberts, C. J. (2013). Non-Arrhenius protein aggregation. *The AAPS journal*, 15(3), 840-851. <https://doi.org/10.1208/s12248-013-9485-3>

Wang, X., Chen, H., Li, S., Zhou, J., & Xu, J. (2016). Physico-chemical properties, antioxidant activities and antihypertensive effects of walnut protein and its hydrolysate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), 2579-2587. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7379>

Wang, X., Yu, H., Xing, R., & Li, P. (2017). Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides. *BioMed research international*, 2017(1), 9746720. <https://doi.org/10.1155/2017/9746720>

Webb, E. C. (1993). Enzyme nomenclature: a personal retrospective. *The FASEB Journal*, 7(12), 1192-1194. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.12.8375619>

Welderufael, F. T., Gibson, T., Methven, L., & Jauregi, P. (2012). Chemical characterisation and determination of sensory attributes of hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis of whey proteins following a novel integrative process. *Food chemistry*, 134(4), 1947-1958. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.113>

Welderufael, F., & Jauregi, P. (2010). Development of an integrative process for the production of bioactive peptides from whey by proteolytic commercial mixtures. *Separation Science and Technology*, 45(15), 2226-2234. <https://doi.org/10.1080/01496395.2010.507662>

Wen, Q., Zhang, L., Zhao, F., Chen, Y., Su, Y., Zhang, X., ... & Zheng, T. (2023). Production technology and functionality of bioactive peptides. *Current Pharmaceutical Design*, 29(9), 652-674. <https://doi.org/10.2174/1381612829666230201121353>

Wouters, A. G., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems.

*Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786-800.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12209>

Wu, R., He, B., Zhang, B., Zhao, G., Li, J., & Li, X. (2014b). Preparation of immobilized pectinase on regenerated cellulose beads for removing anionic trash in whitewater from papermaking. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(7), 1103-1109.  
<https://doi.org/10.1002/jctb.4223>

Wubshet, S. G., Måge, I., Böcker, U., Lindberg, D., Knutsen, S. H., Rieder, A., ... & Afseth, N. K. (2017). FTIR as a rapid tool for monitoring molecular weight distribution during enzymatic protein hydrolysis of food processing by-products. *Analytical Methods*, 9(29), 4247-4254. <https://doi.org/10.1039/C7AY00865A>

Xia, Y., Yu, J., Xu, W., & Shuang, Q. (2020). Purification and characterization of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from whey proteins of milk fermented with *Lactobacillus plantarum* QS670. *Journal of Dairy Science*, 103(6), 4919-4928.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17594>

Xie, H., Zhang, L., Chen, Q., Hu, J., Zhang, P., Xiong, H., & Zhao, Q. (2023). Combined effects of drying methods and limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and antioxidant properties of rice protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 52, 102427.  
<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102427>

Xu, C., Tong, S., Sun, L., & Gu, X. (2023). Cellulase immobilization to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: an all-inclusive review. *Carbohydrate Polymers*, 321, 121319. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121319>

Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33(6), 756-774.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>

Yang, A., Long, C., Xia, J., Tong, P., Cheng, Y., Wang, Y., & Chen, H. (2017). Enzymatic characterisation of the immobilised Alcalase to hydrolyse egg white protein for potential allergenicity reduction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 199-206.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.7712>

Yassin, F. (2024). *Influence of enzyme concentration on the Michaelis-Menten constant: A new theory for isolated cases*. [Preprint]. SSRN 4827561.  
<https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4827561>

Yathisha, U. G., Vaidya, S., & Sheshappa, M. B. (2022). Functional properties of protein hydrolyzate from ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) as prepared by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 187-203. <https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2027964>

You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.007>

Yust, M. D. M., Pedroche, J., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Vioque, J., Mateo, C., ... & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Partial purification and immobilization/stabilization on highly activated glyoxyl-agarose supports of different proteases from flavourzyme. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6503-6508. <https://doi.org/10.1021/jf0709471>

Zaky, A. A., Simal-Gandara, J., Eun, J. B., Shim, J. H., & Abd El-Aty, A. M. (2022). Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review. *Frontiers in Nutrition*, 8, 815640. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>

Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8(2), 92. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>

Zhang, Q. X., Wu, H., Ling, Y. F., & Lu, R. R. (2013). Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. *Journal of Dairy Research*, 80(3), 367-373. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000320>

Zhao, L., Huang, Q., Huang, S., Lin, J., Wang, S., Huang, Y., ... & Rao, P. (2014). Novel peptide with a specific calcium-binding capacity from whey protein hydrolysate and the possible chelating mode. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(42), 10274-10282. <https://doi.org/10.1021/jf502412f>

Zhao, X., Cheng, Y., Xu, J., & Cui, C. (2025). Dopamine-modified hydrated silica immobilized Flavourzyme for efficient bioactive peptide release from  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 487, 144725. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144725>

Zhou, W., Apkarian, R., Wang, Z. L., & Joy, D. (2007). Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). In *Scanning microscopy for nanotechnology: Techniques and applications* (pp. 1-40). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-39620-0_1)

Zhu, H., Zhang, Y., Yang, T., Zheng, D., Liu, X., Zhang, J., & Zheng, M. (2022). Preparation of immobilized Alcalase based on metal affinity for efficient production of bioactive peptides. *Lwt*, *162*, 113505. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113505>

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), 72. <https://doi.org/10.3390/molecules21010072>

Zucca, P., & Sanjust, E. (2014). Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, *19*(9), 14139-14194. <https://doi.org/10.3390/molecules190914139>

Žuža, M. G., Milašinović, N. Z., Jonović, M. M., Jovanović, J. R., Kalagasidis Krušić, M. T., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2017). Design and characterization of alcalase–chitosan conjugates as potential biocatalysts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *40*, 1713-1723. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1826-7>

# **ANEXOS**

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Materiales y métodos. Caracterización bioquímica, funcional y cinética de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado libre

#### 1.1. Cálculo del peso molecular de *Flavourzyme*®

El peso molecular de *Flavourzyme*® se calculó teniendo en cuenta la información reportada por Merz et al. (2015b). En la **Tabla A1.1** se encuentra el detalle de los datos obtenidos y calculados.

**Tabla A1.1.** Cálculo del peso molecular de *Flavourzyme*®.

Enzimas	Pureza aparente (%)	Actividad total	Actividad específica	Recuperación (%)	Enzima (mg)	Abundancia	PM (g/mol)	PM corregido (g/mol)
LAPA	90	9,5 nkat	10,7 nkat/mg	42,00	1,9×10 <sup>0</sup>	5,8×10 <sup>-2</sup>	32500	1870,44
LAP2	88	1,5 nkat	6,6 nkaut/mg	42,00	4,8×10 <sup>-1</sup>	1,4×10 <sup>-2</sup>	51900	747,61
DPP4	40	1,8 nkat	603,0 nkat/mg	36,00	3,3×10 <sup>-3</sup>	1,0×10 <sup>-4</sup>	85100	8,54
DPP5	94	30,1 nkat	133,0 ACU/mg	475,00	4,5×10 <sup>-2</sup>	1,4×10 <sup>-3</sup>	78600	106,49
NP1*	100	450,0 ACU	775,0 ACU/mg	7,67	7,6×10 <sup>0</sup>	2,3×10 <sup>-1</sup>	42400	9713,97
NP2	89	9,0 ACU	6,3 ACU/mg	7,67	1,7×10 <sup>1</sup>	5,0×10 <sup>-1</sup>	19000	9531,60
ALP1*	100	151,0 ACU	495,0 ACU/mg	7,67	4,0×10 <sup>0</sup>	1,2×10 <sup>-1</sup>	29000	3490,52
AMY3*	100	2950,0 nkat	2190,0 nkat/mg	54,00	2,5×10 <sup>0</sup>	7,5×10 <sup>-2</sup>	52500	3961,60
<b>Totales</b>					<b>3,3×10<sup>1</sup></b>	<b>1,00×10<sup>0</sup></b>		<b>29431</b>

Siglas de las enzimas: LAPA: Leucina aminopeptidasa A; LAP2: Leucina aminopeptidasa 2; DPP4: Dipeptidil peptidasa 4; DPP5: Dipeptidil peptidasa 5; NP1: Proteasa neutra 1; NP2: Proteasa neutra 2; ALP1: Proteasa alcalina 1; AMY3: α-amilasa tipo A 3.

\* la pureza aparente reportada por Merz et al. (2015b) fue >95. Para el cálculo se consideró esta pureza aparente como 100%.

nkat: unidad derivada del Sistema Internacional de Unidades para medir la actividad catalítica, definida como la actividad catalítica responsable de la transformación de un mol de compuesto por segundo.

ACU: unidad de azocaseína definida como el aumento de una unidad de absorbancia por minuto a 450 nm en NaOH 0,25 M.

$$\text{Enzima (mg)} = \frac{\text{Actividad total}}{\text{Actividad específica}} \times \frac{\text{Pureza aparente}}{\text{Recuperación}}$$

$$\text{Abundancia} = \frac{\text{Enzima}}{\text{Enzima total}}$$

$$\text{Peso molecular corregido} \left( \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) = \frac{\text{Abundancia}}{\text{Peso molecular}}$$

## Anexo 2. Materiales y métodos. Estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con *Alcalase*® en estado libre

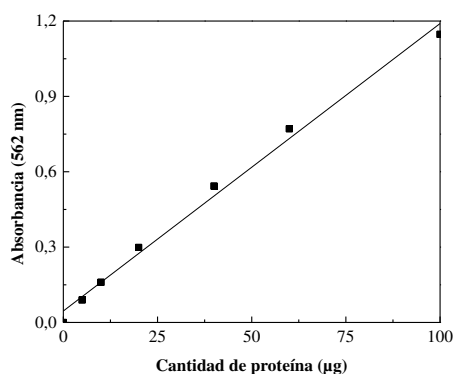
### 2.1. Determinación del contenido de proteína mediante el ensayo del ácido bicinconínico: complemento técnico

El reactivo de trabajo estándar (SWR) para el ensayo del ácido bicinconínico se preparó mezclando 100 volúmenes del reactivo A y 2 volúmenes del reactivo B.

El reactivo A se obtuvo disolviendo 0,1 g de bicinconinato disódico, 2 g de carbonato de sodio monohidrato, 0,16 g de tartrato de sodio dihidrato, 0,4 g de hidróxido de sodio y 0,95 g de carbonato ácido de sodio anhidro en agua ultrapura. En el caso de que haya sido necesario, el pH se ajustó a 11,25 antes de enraizar el matraz aforado de 100 mL. Mientras que, el reactivo B se preparó disolviendo 0,4 g sulfato de cobre pentahidrato en agua ultrapura, en un volumen final de 10 mL en matraz aforado.

Los reactivos A y B son estables indefinidamente a temperatura ambiente, mientras que el SWR, de color verde manzana, se mantiene estable a temperatura ambiente durante una semana.

Como se indicó en la **sección 3.3.4.3**, se utilizó como estándar la albúmina sérica bovina. La **Figura A2.1** muestra una de las curvas de referencia obtenida con distintos volúmenes (0, 5, 10, 20, 40, 60 y 100  $\mu$ L) de una solución madre 1 mg/mL de albúmina sérica bovina.



**Figura A2.1.** Curva de referencia con albúmina sérica bovina para los ensayos de determinación del contenido de proteína con el ensayo del ácido bicinconínico.

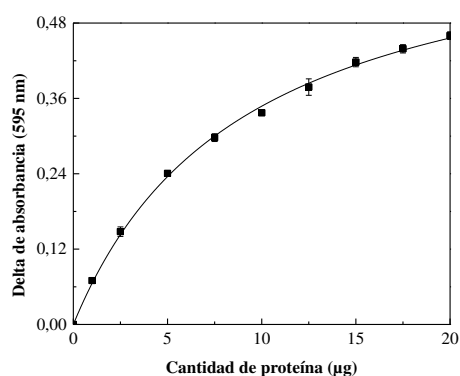
### Anexo 3. Materiales y métodos. Estudios de inmovilización

#### 3.1. Determinación del contenido de proteína mediante el ensayo de Bradford: protocolo detallado

El reactivo de Bradford para la determinación del contenido proteína se preparó disolviendo 0,1 g de *Coomassie Blue G-250* en etanol al 96% (v/v) durante 1 h, bajo agitación constante. La mezcla se llevó a un volumen final de 50 mL en un matraz aforado. A continuación, se adicionaron 100 mL de ácido fosfórico al 85% (m/m) y se llevó a 1 L con agua ultrapura, utilizando también un matraz aforado. Por último, la solución se filtró dos o tres veces en papel Whatman N°1 o papel de filtro común, según la disponibilidad.

El reactivo final obtenido presenta una coloración marrón suave característica y no debe contener sustancias coloidales sin disolver. Se almacena a temperatura ambiente en un frasco color caramelo y, siempre que sea posible, en oscuridad. Este reactivo es estable durante 2 a 3 meses. Si se forma un precipitado durante el almacenamiento, se puede recuperar el reactivo filtrándolo y realizando una nueva curva de calibrado.

Como se indicó en la **sección 3.4.1**, se utilizó como estándar la albúmina sérica bovina. La **Figura A3.1** muestra una de las curvas de referencia obtenida con distintos volúmenes (2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40  $\mu$ L) de una solución madre 1 mg/mL de albúmina sérica bovina, diluida al medio.



**Figura A3.1.** Curva de referencia con albúmina sérica bovina para los ensayos de determinación del contenido de proteína con el ensayo de Bradford.

**Anexo 4. Resultados y discusión. Caracterización de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado libre**

**Tabla A4.1.** Actividad relativa de *Alcalase*® en estado libre, pre-incubada a distintas temperaturas y tiempos (pH 9).

Tiempo (min)	Actividad relativa (%)					
	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C	80°C
0	100,00±0,48 <sup>o</sup>	100,00±0,48 <sup>o</sup>	100,00±2,33 <sup>o</sup>	99,73±1,06 <sup>o</sup>	100,00±2,98 <sup>o</sup>	100,00±16,36 <sup>o</sup>
2	-	-	-	100,00±0,63 <sup>o</sup>	86,57±2,26 <sup>kl</sup>	35,04±1,85 <sup>e</sup>
4	-	-	-	98,53±0,07 <sup>ño</sup>	88,52±0,02 <sup>lm</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
6	-	-	-	95,11±4,53 <sup>nño</sup>	69,79±0,16 <sup>h</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
8	-	-	-	90,11±5,15 <sup>lmn</sup>	53,53±0,01 <sup>g</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
10	96,49±0,92 <sup>ño</sup>	99,10±0,10 <sup>ño</sup>	93,29±4,69 <sup>mnñ</sup>	89,43±2,27 <sup>lmn</sup>	27,58±2,12 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
15	-	-	-	68,25±6,43 <sup>h</sup>	1,17±0,23 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
20	98,41±0,28 <sup>ño</sup>	96,30±0,26 <sup>ño</sup>	76,33±1,41 <sup>ij</sup>	40,12±0,77 <sup>e</sup>	1,04±0,30 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
25	-	-	-	17,77±2,49 <sup>c</sup>	1,07±0,22 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
30	-	-	-	6,52±0,17 <sup>b</sup>	0,84±0,10 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
40	94,95±0,40 <sup>nño</sup>	81,45±1,48 <sup>jk</sup>	46,73±3,30 <sup>f</sup>	-	-	-
65	88,63±0,52 <sup>lm</sup>	78,76±1,78 <sup>i</sup>	27,36±1,83 <sup>d</sup>	-	-	-
120	81,35±1,17 <sup>jk</sup>	50,95±0,10 <sup>fg</sup>	1,58±0,08 <sup>ab</sup>	-	-	-
240	72,70±3,92 <sup>hi</sup>	15,34±0,89 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,55±0,03 <sup>a</sup>	1,94±0,62 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
<b>Factor A: Temperatura</b>			*	<b>Factor A</b>		*
<b>Factor B: Tiempo</b>			*	<b>Factor B</b>		*
<b>Interacción AB</b>			*	<b>Interacción AB</b>		*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A4.2.** Actividad relativa de *Flavourzyme*® en estado libre, pre-incubada a distintas temperaturas y tiempos (pH 7,5).

Tiempo (min)	Actividad relativa (%)				
	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C
0	100,00±0,51 <sup>n</sup>	100,00±0,51 <sup>n</sup>	100,00±1,81 <sup>n</sup>	100,00±0,78 <sup>n</sup>	100,00±7,53 <sup>n</sup>
10	88,97±0,02 <sup>m</sup>	79,86±0,77 <sup>l</sup>	47,04±1,41 <sup>h</sup>	21,59±0,11 <sup>f</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
20	87,03±0,77 <sup>m</sup>	64,55±0,59 <sup>j</sup>	17,79±0,79 <sup>e</sup>	6,43±0,08 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
40	76,17±3,54 <sup>k</sup>	52,88±1,20 <sup>i</sup>	13,49±0,04 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
60	77,96±0,61 <sup>kl</sup>	37,56±2,15 <sup>g</sup>	8,83±0,79 <sup>bc</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
120	63,43±0,91 <sup>j</sup>	23,62±0,94 <sup>f</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
240	63,27±3,26 <sup>j</sup>	11,36±4,29 <sup>cd</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
<b>Factor A: Temperatura</b>					*
<b>Factor B: Tiempo</b>					*
<b>Interacción AB</b>					*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A4.3.** Actividad relativa de *Alcalase*® en estado libre, pre-incubada a distintos valores de pH y tiempos (60°C).

Tiempo (min)	Actividad relativa (%)							
	pH 4,0	pH 6,0	pH 8,0	pH 8,5	pH 9,0	pH 9,5	pH 10,0	pH 12,0
0	100,00±1,18 <sup>n</sup>	97,32±0,27 <sup>klmn</sup>	100,00±1,54 <sup>n</sup>	100,00±2,93 <sup>n</sup>	100,00±2,33 <sup>n</sup>	93,81±0,75 <sup>klmn</sup>	100,00±2,68 <sup>n</sup>	100,00±3,06 <sup>n</sup>
2	-	-	-	-	-	100,00±2,90 <sup>n</sup>	97,57±6,81 <sup>lmn</sup>	9,88±0,45 <sup>b</sup>
4	-	-	-	-	-	99,95±4,20 <sup>n</sup>	98,23±0,90 <sup>lmn</sup>	1,36±0,02 <sup>a</sup>
6	-	-	-	-	-	93,43±3,43 <sup>klm</sup>	95,13±8,14 <sup>klmn</sup>	1,09±0,18 <sup>a</sup>
8	-	-	-	-	-	94,10±7,59 <sup>klmn</sup>	80,84±1,58 <sup>hi</sup>	1,45±0,52 <sup>a</sup>
10	0,00±0,00 <sup>a</sup>	99,23±0,66 <sup>lmn</sup>	95,48±0,78 <sup>klmn</sup>	99,43±3,41 <sup>lmn</sup>	93,29±4,69 <sup>kl</sup>	91,35±4,12 <sup>jk</sup>	69,62±9,58 <sup>g</sup>	0,92±1,10 <sup>a</sup>
15	-	-	-	-	-	77,80±3,67 <sup>jk</sup>	27,34±4,09 <sup>c</sup>	1,03±0,13 <sup>a</sup>
20	0,00±0,00 <sup>a</sup>	100,00±1,63 <sup>n</sup>	76,24±1,02 <sup>b</sup>	80,90±0,52 <sup>hi</sup>	76,33±1,41 <sup>b</sup>	65,88±0,85 <sup>g</sup>	8,91±0,96 <sup>b</sup>	0,89±0,32 <sup>a</sup>
25	-	-	-	-	-	57,42±9,91 <sup>f</sup>	2,78±0,58 <sup>a</sup>	1,37±0,10 <sup>a</sup>
30	-	-	-	-	-	43,16±3,01 <sup>d</sup>	1,96±0,04 <sup>a</sup>	1,88±0,11 <sup>a</sup>
40	0,00±0,00 <sup>a</sup>	98,75±1,55 <sup>lmn</sup>	83,10±2,33 <sup>i</sup>	78,73±3,01 <sup>hi</sup>	46,73±3,30 <sup>de</sup>	-	-	-
60	0,00±0,00 <sup>a</sup>	90,40±0,59 <sup>j</sup>	68,97±0,95 <sup>g</sup>	51,58±1,01 <sup>ef</sup>	27,36±1,83 <sup>c</sup>	-	-	-
120	0,00±0,00 <sup>a</sup>	76,27±0,32 <sup>h</sup>	49,01±1,03 <sup>de</sup>	28,05±0,14 <sup>c</sup>	1,58±0,08 <sup>a</sup>	-	-	-
240	-	-	-	-	-	2,00±2,17 <sup>a</sup>	2,10±1,04 <sup>a</sup>	2,45±1,11 <sup>a</sup>
	<b>Factor A: pH</b>				*	<b>Factor A</b>		*
	<b>Factor B: Tiempo</b>				*	<b>Factor B</b>		*
	<b>Interacción AB</b>				*	<b>Interacción AB</b>		*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A4.4.** Actividad relativa de *Flavourzyme*® en estado libre, pre-incubada a distintos valores de pH y tiempos (50°C).

Tiempo (min)	Actividad relativa (%)						
	pH 5,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0	pH 8,5	pH 10,5
0	100,00±3,60 <sup>m</sup>	78,10±15,76 <sup>kl</sup>	100,00±11,04 <sup>m</sup>	100,00±1,81 <sup>m</sup>	100,00±0,65 <sup>m</sup>	100,00±3,50 <sup>m</sup>	100,00±3,56 <sup>m</sup>
10	78,31±9,91 <sup>kl</sup>	100,00±1,15 <sup>m</sup>	83,61±1,03 <sup>l</sup>	47,04±1,41 <sup>i</sup>	84,23±2,44 <sup>l</sup>	69,92±1,52 <sup>jk</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
20	58,74±9,85 <sup>j</sup>	64,73±5,26 <sup>j</sup>	31,11±0,40 <sup>fgh</sup>	17,79±0,79 <sup>de</sup>	60,12±2,08 <sup>j</sup>	33,44±8,53 <sup>h</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
40	62,37±8,93 <sup>j</sup>	33,43±0,15 <sup>h</sup>	16,78±10,14 <sup>de</sup>	13,49±0,04 <sup>bcde</sup>	31,40±3,69 <sup>fgh</sup>	15,28±4,01 <sup>cde</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
60	21,63±1,71 <sup>efg</sup>	23,99±1,21 <sup>efgh</sup>	20,43±1,87 <sup>ef</sup>	8,83±0,79 <sup>abcd</sup>	32,12±15,55 <sup>gh</sup>	19,75±0,70 <sup>de</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
120	3,10±3,06 <sup>ab</sup>	33,47±3,98 <sup>h</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>	15,72±10,58 <sup>de</sup>	4,18±1,52 <sup>abc</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
<b>Factor A: pH</b>							*
<b>Factor B: Tiempo</b>							*
<b>Interacción AB</b>							*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Aclaración: en el caso del pH 10,5, se realizaron ensayos a otros tiempos (2, 4, 6 y 8 min), obteniendo actividad nula. Esos datos fueron los que se utilizaron para realizar la **Figura 21** y el correspondiente ajuste con el fin de obtener los parámetros de inactivación.

**Tabla A4.5.** Actividad de *Alcalase*® en estado libre, empleando distintas concentraciones de caseína y de enzima.

Caseína ( $\mu\text{M}$ )	Actividad ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )			
	0,8 $\mu\text{M}$ de <i>Alcalase</i> ®	1,5 $\mu\text{M}$ de <i>Alcalase</i> ®	3,0 $\mu\text{M}$ de <i>Alcalase</i> ®	6,0 $\mu\text{M}$ de <i>Alcalase</i> ®
9,8	15,04 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	26,39 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	29,50 $\pm$ 0,87 <sup>b</sup>	29,44 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
24,6	48,22 $\pm$ 1,62 <sup>c</sup>	50,17 $\pm$ 1,83 <sup>c</sup>	52,87 $\pm$ 1,51 <sup>c</sup>	51,35 $\pm$ 1,16 <sup>c</sup>
49,1	91,66 $\pm$ 1,24 <sup>d</sup>	94,59 $\pm$ 1,83 <sup>d</sup>	96,80 $\pm$ 2,01 <sup>d</sup>	97,64 $\pm$ 3,25 <sup>d</sup>
78,6	140,34 $\pm$ 0,98 <sup>e</sup>	155,56 $\pm$ 1,86 <sup>f</sup>	161,58 $\pm$ 1,35 <sup>fg</sup>	163,68 $\pm$ 5,75 <sup>g</sup>
98,3	161,41 $\pm$ 2,46 <sup>fg</sup>	185,49 $\pm$ 4,24 <sup>h</sup>	196,38 $\pm$ 1,89 <sup>ij</sup>	202,67 $\pm$ 0,54 <sup>i</sup>
147,4	194,03 $\pm$ 1,92 <sup>i</sup>	251,14 $\pm$ 1,61 <sup>l</sup>	288,83 $\pm$ 5,69 <sup>m</sup>	298,17 $\pm$ 1,72 <sup>n</sup>
196,6	214,62 $\pm$ 4,29 <sup>k</sup>	295,51 $\pm$ 2,27 <sup>mn</sup>	367,70 $\pm$ 3,85 <sup>p</sup>	384,81 $\pm$ 8,63 <sup>q</sup>
235,9	214,76 $\pm$ 7,74 <sup>k</sup>	322,50 $\pm$ 8,39 <sup>o</sup>	417,71 $\pm$ 4,74 <sup>f</sup>	430,25 $\pm$ 3,47 <sup>s</sup>
<b>Factor A: Concentración de caseína</b>				*
<b>Factor B: Concentración de enzima</b>				*
<b>Interacción AB</b>				*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A4.6.** Actividad de *Flavourzyme*® en estado libre, empleando distintas concentraciones de caseína y de enzima.

Caseína ( $\mu\text{M}$ )	Actividad ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )			
	11,8 $\mu\text{M}$ de <i>Flavourzyme</i> ®	23,5 $\mu\text{M}$ de <i>Flavourzyme</i> ®	46,5 $\mu\text{M}$ de <i>Flavourzyme</i> ®	94,1 $\mu\text{M}$ de <i>Flavourzyme</i> ®
9,8	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>
24,6	8,18 $\pm$ 0,98 <sup>b</sup>	15,61 $\pm$ 1,47 <sup>bc</sup>	14,68 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	9,36 $\pm$ 2,00 <sup>b</sup>
49,1	22,70 $\pm$ 2,34 <sup>cd</sup>	45,22 $\pm$ 0,82 <sup>e</sup>	53,41 $\pm$ 3,26 <sup>fg</sup>	55,87 $\pm$ 1,03 <sup>g</sup>
78,6	23,07 $\pm$ 4,97 <sup>cd</sup>	59,90 $\pm$ 4,92 <sup>g</sup>	92,27 $\pm$ 0,71 <sup>i</sup>	104,23 $\pm$ 4,66 <sup>j</sup>
98,3	29,15 $\pm$ 4,09 <sup>d</sup>	75,37 $\pm$ 6,78 <sup>h</sup>	114,44 $\pm$ 3,63 <sup>k</sup>	132,05 $\pm$ 4,01 <sup>l</sup>
147,4	28,22 $\pm$ 0,06 <sup>d</sup>	76,30 $\pm$ 1,40 <sup>h</sup>	140,36 $\pm$ 6,50 <sup>m</sup>	187,90 $\pm$ 6,69 <sup>n</sup>
196,6	27,39 $\pm$ 0,67 <sup>d</sup>	88,16 $\pm$ 2,75 <sup>i</sup>	162,41 $\pm$ 3,89 <sup>n</sup>	237,53 $\pm$ 0,07 <sup>o</sup>
235,9	46,68 $\pm$ 7,96 <sup>ef</sup>	91,01 $\pm$ 9,31 <sup>i</sup>	163,40 $\pm$ 2,05 <sup>n</sup>	254,60 $\pm$ 1,20 <sup>p</sup>
<b>Factor A: Concentración de caseína</b>				*
<b>Factor B: Concentración de enzima</b>				*
<b>Interacción AB</b>				*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla A4.7.** Productividad de *Alcalase*® (pH 9) y *Flavourzyme*® (pH 7,5) en estado libre, evaluada a distintas temperaturas y tiempos de reacción.

Temperatura (°C)	Actividad relativa (%)			
	<i>Alcalase</i> ®		<i>Flavourzyme</i> ®	
	1 h	2 h	1 h	2 h
26	38,25±3,54 <sup>a</sup>	54,77±2,41 <sup>c</sup>	37,94±2,90 <sup>a</sup>	73,99±0,78 <sup>e</sup>
30	45,69±1,16 <sup>b</sup>	64,43±2,59 <sup>de</sup>	48,92±0,75 <sup>b</sup>	78,83±0,83 <sup>e</sup>
35	58,36±0,63 <sup>cd</sup>	71,39±1,04 <sup>g</sup>	57,79±1,38 <sup>c</sup>	92,62±1,02 <sup>f</sup>
40	61,05±0,20 <sup>cd</sup>	79,17±0,28 <sup>h</sup>	74,08±7,51 <sup>e</sup>	100,00±0,58 <sup>g</sup>
45	70,37±1,52 <sup>ef</sup>	100,00±3,63 <sup>j</sup>	77,73±2,71 <sup>e</sup>	87,41±1,87 <sup>f</sup>
50	77,06±1,20 <sup>gh</sup>	86,99±8,01 <sup>i</sup>	51,98±0,36 <sup>b</sup>	63,80±1,35 <sup>d</sup>
<b>Factor A: Temperatura</b>		*	<b>Factor A</b>	*
<b>Factor B: Tiempo</b>		*	<b>Factor B</b>	*
<b>Interacción AB</b>		*	<b>Interacción AB</b>	*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes, para cada enzima, indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A4.8.** Productividad de *Alcalase*® (45°C) y *Flavourzyme*® (40°C) en estado libre, evaluada a distintos valores de pH y tiempos de reacción.

pH	Actividad relativa (%)			
	<i>Alcalase</i> ®		<i>Flavourzyme</i> ®	
	1 h	2 h	1 h	2 h
4,0	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,32±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
6,0	41,27±0,91 <sup>b</sup>	51,26±0,53 <sup>c</sup>	71,58±0,03 <sup>b</sup>	84,44±0,33 <sup>c</sup>
7,5	88,59±0,23 <sup>d</sup>	96,83±0,10 <sup>e</sup>	95,74±0,93 <sup>f</sup>	100,00±0,41 <sup>g</sup>
9,0	98,03±0,43 <sup>h</sup>	100,00±0,54 <sup>i</sup>	87,27±0,87 <sup>d</sup>	93,22±0,53 <sup>e</sup>
11,0	91,63±0,75 <sup>e</sup>	93,22±0,35 <sup>f</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
<b>Factor A: pH</b>		*	<b>Factor A</b>	*
<b>Factor B: Tiempo</b>		*	<b>Factor B</b>	*
<b>Interacción AB</b>		*	<b>Interacción AB</b>	*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes, para cada enzima, indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A4.9.** Actividad relativa de *Alcalase*<sup>®</sup> en estado libre, evaluada en presencia de diferentes concentraciones de sales.

Sal	Actividad relativa (%)		
	0,1 mM	1 mM	2 mM
-	100,00±0,61 <sup>gh</sup>	100,00±1,47 <sup>gh</sup>	100,00±0,83 <sup>gh</sup>
CaCl <sub>2</sub>	103,56±0,73 <sup>klm</sup>	106,04±0,38 <sup>m</sup>	105,64±0,25 <sup>lm</sup>
CoSO <sub>4</sub>	111,50±2,18 <sup>n</sup>	102,69±3,30 <sup>ijk</sup>	109,68±2,13 <sup>n</sup>
CuSO <sub>4</sub>	101,96±1,30 <sup>hij</sup>	91,21±0,29 <sup>d</sup>	42,99±0,84 <sup>a</sup>
Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	102,34±3,20 <sup>ijk</sup>	101,46±3,08 <sup>hij</sup>	100,43±2,27 <sup>fghi</sup>
MgSO <sub>4</sub>	98,23±2,23 <sup>efg</sup>	100,95±1,73 <sup>hij</sup>	100,33±0,03 <sup>fghi</sup>
MnCl <sub>2</sub>	100,96±1,52 <sup>hij</sup>	97,91±0,58 <sup>ef</sup>	91,92±2,08 <sup>d</sup>
NiSO <sub>4</sub>	101,41±1,44 <sup>hij</sup>	104,66±1,44 <sup>klm</sup>	96,02±2,21 <sup>e</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	103,14±1,27 <sup>jk</sup>	86,34±1,10 <sup>c</sup>	79,34±0,44 <sup>b</sup>
<b>Factor A: Presencia de sal</b>			*
<b>Factor B: Sal</b>			*
<b>Factor C: Concentración de la sal</b>			*
<b>Interacciones (dobles y triple)</b>			*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A4.10.** Actividad relativa de *Flavourzyme*<sup>®</sup> en estado libre, evaluada en presencia de diferentes concentraciones de sales.

Sal	Actividad relativa (%)		
	0,1 mM	1 mM	2 mM
-	100,00±0,63 <sup>g</sup>	100,00±4,01 <sup>g</sup>	100,00±4,01 <sup>g</sup>
CaCl <sub>2</sub>	96,30±4,12 <sup>fg</sup>	123,60±2,69 <sup>l</sup>	122,17±0,70 <sup>l</sup>
CoSO <sub>4</sub>	116,66±1,45 <sup>ijkl</sup>	91,80±2,10 <sup>ef</sup>	95,76±1,93 <sup>fg</sup>
CuSO <sub>4</sub>	90,78±1,01 <sup>ef</sup>	31,84±1,78 <sup>a</sup>	31,79±6,35 <sup>a</sup>
Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	107,08±0,12 <sup>hi</sup>	112,30±6,52 <sup>ijk</sup>	102,02±0,82 <sup>gh</sup>
MgSO <sub>4</sub>	112,86±0,96 <sup>ijk</sup>	111,45±1,80 <sup>ij</sup>	119,07±8,42 <sup>kl</sup>
MnCl <sub>2</sub>	97,90±0,26 <sup>fg</sup>	91,42±0,23 <sup>ef</sup>	76,39±1,69 <sup>c</sup>
NiSO <sub>4</sub>	86,56±0,58 <sup>de</sup>	44,71±0,27 <sup>b</sup>	36,22±1,46 <sup>a</sup>
ZnCl <sub>2</sub>	99,81±1,64 <sup>gh</sup>	82,69±1,69 <sup>cd</sup>	80,33±5,60 <sup>cd</sup>
<b>Factor A: Presencia de sal</b>			*
<b>Factor B: Sal</b>			*
<b>Factor C: Concentración de la sal</b>			*
<b>Interacciones (dobles y triple)</b>			*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

**Anexo 5. Resultados y discusión. Estudios de obtención y caracterización de hidrolizados de WPC-80 con *Alcalase*® en estado libre**

**Tabla A5.1.** Contenido de proteína, actividad antioxidante (AAO) y actividad antihipertensiva (AAH) de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados con cromatografía de filtración en gel.

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
22,1	0	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	85,12±41,40 <sup>CDb</sup>	2,38±0,08 <sup>Aa</sup>
	1	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	188,92±2,44 <sup>Fc</sup>	5,22±1,01 <sup>ABCab</sup>
	2	29,89±1,36 <sup>Db</sup>	121,26±25,06 <sup>DEbc</sup>	7,08±3,72 <sup>BCDEab</sup>
	3	119,89±1,74 <sup>Gd</sup>	446,58±3,73 <sup>He</sup>	32,40±0,67 <sup>Kd</sup>
	4	107,70±1,12 <sup>Fc</sup>	707,95±18,59 <sup>Jf</sup>	39,40±0,54 <sup>Lc</sup>
	5	31,30±0,25 <sup>Db</sup>	674,63±29,00 <sup>Jf</sup>	32,10±2,93 <sup>Kd</sup>
	6	3,40±0,74 <sup>Aa</sup>	289,70±100,67 <sup>Gd</sup>	8,63±3,42 <sup>DEFGb</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	184,40±16,55 <sup>Fc</sup>	6,36±0,41 <sup>BCDab</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	87,41±25,02 <sup>CDb</sup>	4,05±0,33 <sup>ABab</sup>
29,1	9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	15,13±3,31 <sup>Jc</sup>
	0	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	13,16±0,34 <sup>HIIf</sup>
	1	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	106,68±6,62 <sup>Def</sup>	13,74±2,43 <sup>IIf</sup>
	2	21,44±0,62 <sup>Cc</sup>	117,03±2,60 <sup>DEf</sup>	8,83±0,62 <sup>DEFGbcd</sup>
	3	134,17±5,27 <sup>He</sup>	400,66±41,05 <sup>Hi</sup>	63,59±1,76 <sup>Mi</sup>
	4	60,86±2,11 <sup>Ed</sup>	778,26±2,61 <sup>Kk</sup>	63,67±1,59 <sup>Mi</sup>
	5	9,60±0,00 <sup>Bb</sup>	528,71±10,25 <sup>Ij</sup>	31,36±0,34 <sup>Kh</sup>
	6	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	302,19±7,69 <sup>Gh</sup>	16,16±0,87 <sup>Jg</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	70,29±5,36 <sup>BCDcd</sup>	9,02±2,55 <sup>DEFGbcd</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	174,91±26,60 <sup>EFg</sup>	10,27±0,62 <sup>EFGHcde</sup>
	9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	84,76±3,86 <sup>CDdef</sup>	6,89±1,10 <sup>BCDab</sup>
	10	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	8,57±0,87 <sup>CDEFGbcd</sup>
	11	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	44,70±5,25 <sup>ABCbc</sup>	5,77±0,36 <sup>BCDa</sup>
12	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	22,58±9,28 <sup>ABab</sup>	7,27±0,30 <sup>BCDEFab</sup>	
13	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	78,60±36,49 <sup>BCDcde</sup>	11,69±0,40 <sup>GHIef</sup>	

Continuación de la **Tabla A5.1.**

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
29,1	14	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	181,06±0,00 <sup>Fg</sup>	8,25±0,31 <sup>CDEFbc</sup>
	15	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	10,56±0,91 <sup>FGHIde</sup>

Letras mayúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).  
Letras minúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para muestras de un mismo DH.

Proteína determinada con el ensayo del ácido bicinonínico, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. A las muestras cuyo resultado fue 0 µg de proteína se les asignó el valor mínimo detectable por la técnica (2 µg).

DH: grado de hidrólisis.

Contenido de proteína, AAO y AAH (dilución 1/2) de las muestras de partida tratadas por centrifugación y ultrafiltración (WPH-CF):

-22,1% DH: 1185,61±33,91 µg, 10454,10±75,77 µM y 87,25±0,26%.

-29,1% DH: 1111,93±12,41 µg, 13572,64±951,11 µM y 95,49±2,80%.

**Tabla A5.2.** Contenido de proteína, actividad antioxidante (AAO) y actividad antihipertensiva (AAH) de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados con cromatografía de intercambio aniónico débil.

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
22,1	0	47,70±0,12 <sup>Ec</sup>	143,28±19,13 <sup>FGbc</sup>	31,30±3,02 <sup>ff</sup>
	1	3,05±0,25 <sup>Bb</sup>	126,78±46,60 <sup>Fb</sup>	3,70±2,24 <sup>ABabc</sup>
	2	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	33,05±43,89 <sup>ABCa</sup>	1,25±0,13 <sup>Aab</sup>
	3	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	285,08±65,18 <sup>ld</sup>	10,14±0,30 <sup>DEFde</sup>
	4	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	14,12±3,60 <sup>FGe</sup>
	5	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	222,81±13,20 <sup>Hcd</sup>	13,88±6,58 <sup>FGe</sup>
	6	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	5,95±0,06 <sup>BCbcd</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	22,87±6,31 <sup>ABa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	9,16±0,13 <sup>CDcde</sup>
	9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	183,53±64,72 <sup>GHbc</sup>	1,09±0,07 <sup>Aab</sup>
29,1	0	46,04±0,50 <sup>Cc</sup>	572,88±5,46 <sup>Je</sup>	45,09±1,88 <sup>Jh</sup>
	1	9,19±1,49 <sup>Cb</sup>	120,99±0,00 <sup>EFc</sup>	18,92±0,00 <sup>Hg</sup>
	2	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	13,57±2,55 <sup>EFGdef</sup>
	3	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	173,87±5,31 <sup>GHd</sup>	10,55±2,01 <sup>DEFGcd</sup>
	4	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	73,37±11,17 <sup>CDEb</sup>	7,23±0,42 <sup>BCDb</sup>
	5	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	14,29±1,66 <sup>Gf</sup>
	6	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	54,46±12,40 <sup>BCDb</sup>	14,10±0,06 <sup>FGef</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	9,51±1,88 <sup>CDEbc</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	115,67±23,90 <sup>EFc</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	102,63±27,66 <sup>EFGc</sup>	1,24±0,47 <sup>Aa</sup>
	10	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	11,03±1,28 <sup>DEFGcdef</sup>
	11	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	9,63±2,90 <sup>CDEbc</sup>
	12	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	13	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	11,09±0,59 <sup>DEFGcdef</sup>
14	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	14,26±2,29 <sup>Gef</sup>	

Continuación de la **Tabla A5.2.**

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
29,1	15	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	11,03±1,81 <sup>DEFGede</sup>
	16	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	9,71±0,94 <sup>CDEbc</sup>

Letras mayúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).  
Letras minúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para muestras de un mismo DH.

Proteína determinada con el ensayo del ácido bicinconínico, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. A las muestras cuyo resultado fue 0 µg de proteína se les asignó el valor mínimo detectable por la técnica (2 µg).

DH: grado de hidrólisis.

Contenido de proteína, AAO y AAH (dilución 1/2) de las muestras de partida tratadas por centrifugación y ultrafiltración (WPH-CF):

-22,1% DH: 1185,61±33,91 µg, 10454,10±75,77 µM y 87,25±0,26%.

-29,1% DH: 1111,93±12,41 µg, 13572,64±951,11 µM y 95,49±2,80%.

Fuerza iónica del *buffer* fosfato 50 mM (pH 7) utilizado para eluir las muestras: baja: 0-0,3 M NaCl; media: 0,4-0,6 M NaCl; alta: 0,75-2,5 M NaCl:

-22,1% DH: FA 0 a 4; FA 5 a 6; FA 7 a 10.

-29,1% DH: FA 0 a 6; FA 7 a 9; FA 10 a 16.

**Tabla A5.3.** Contenido de proteína, actividad antioxidante (AAO) y actividad antihipertensiva (AAH) de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados con cromatografía de intercambio aniónico fuerte.

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
22,1	0	51,74±0,37 <sup>Dc</sup>	726,85±28,18 <sup>Ec</sup>	46,37±5,13 <sup>Lf</sup>
	1	10,21±0,50 <sup>Cb</sup>	81,49±23,78 <sup>Ba</sup>	16,79±1,85 <sup>Jc</sup>
	2	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	18,57±15,21 <sup>Aba</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	3	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	4	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	55,02±1,57 <sup>ABa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	5	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	7,27±1,76 <sup>DEc</sup>
	6	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	297,21±130,82 <sup>Cb</sup>	3,55±0,89 <sup>BCb</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	16,79±23,75 <sup>ABa</sup>	8,84±0,12 <sup>EFGHc</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	32,69±21,42 <sup>ABa</sup>	8,04±0,47 <sup>EFc</sup>
	9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	1,97±2,79 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	10	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	7,91±0,22 <sup>DEFc</sup>
	11	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	12,69±0,10 <sup>ld</sup>
	12	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,60±0,17 <sup>ABab</sup>
	13	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	36,06±48,39 <sup>ABa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	14	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	8,27±2,20 <sup>EFc</sup>
15	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	85,53±116,74 <sup>Ba</sup>	3,45±0,13 <sup>ABCb</sup>	
29,1	0	50,86±2,61 <sup>Dc</sup>	610,28±1,29 <sup>Dc</sup>	54,19±1,39 <sup>Mh</sup>
	1	4,29±0,19 <sup>Bb</sup>	32,51±7,71 <sup>ABb</sup>	24,74±0,72 <sup>Kg</sup>
	2	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	11,77±0,55 <sup>FHlef</sup>
	3	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	5,43±1,13 <sup>CDEcd</sup>
	4	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	5	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,68±0,36 <sup>ABab</sup>
	6	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	4,48±0,92 <sup>CDbc</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	8,47±2,35 <sup>EFGde</sup>
9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	12,07±2,04 <sup>Hlef</sup>	

Continuación de la **Tabla A5.3**.

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
29,1	10	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	13,85±3,59 <sup>IIf</sup>
	11	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	12	2,80±1,05 <sup>Aab</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	13	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	11,07±4,43 <sup>FGHIef</sup>

Letras mayúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).  
Letras minúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para muestras de un mismo DH.

Proteína determinada con el ensayo del ácido bicinónico, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. A las muestras cuyo resultado fue 0 µg de proteína se les asignó el valor mínimo detectable por la técnica (2 µg).

DH: grado de hidrólisis.

Contenido de proteína, AAO y AAH (dilución 1/2) de las muestras de partida tratadas por centrifugación y ultrafiltración (WPH-CF):

-22,1% DH: 1185,61±33,91 µg, 10454,10±75,77 µM y 87,25±0,26%.

-29,1% DH: 1111,93±12,41 µg, 13572,64±951,11 µM y 95,49±2,80%.

Fuerza iónica del *buffer* fosfato 50 mM (pH 7) utilizado para eluir las muestras: baja: 0-0,3 M NaCl; media: 0,4-0,6 M NaCl; alta: 0,75-2,5 M NaCl:

-22,1% DH: FA 0 a 7; FA 8 a 11; FA 12 a 15.

-29,1% DH: FA 0 a 5; FA 6 a 9; FA 10 a 13.

**Tabla A5.4.** Contenido de proteína, actividad antioxidante (AAO) y actividad antihipertensiva (AAH) de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados con cromatografía de catiónico fuerte.

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
22,1%	0	58,32±0,50 <sup>Ec</sup>	378,84±16,41 <sup>Ge</sup>	46,55±15,43 <sup>Lc</sup>
	1	5,25±0,06 <sup>Bb</sup>	49,58±5,95 <sup>BCab</sup>	14,54±1,42 <sup>GHb</sup>
	2	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	132,95±88,36 <sup>Ecd</sup>	7,12±0,06 <sup>BCDEFab</sup>
	3	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	80,89±10,96 <sup>BCDbc</sup>	12,48±0,47 <sup>DEFGHb</sup>
	4	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	57,12±31,43 <sup>BCabc</sup>	14,35±0,15 <sup>GHb</sup>
	5	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	84,53±11,08 <sup>CDbc</sup>	5,44±1,97 <sup>ABCab</sup>
	6	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	106,44±33,39 <sup>DEbc</sup>	5,23±0,25 <sup>ABCab</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	11,51±2,07 <sup>CDEFGab</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	196,77±58,77 <sup>Fd</sup>	6,67±1,10 <sup>ABCDEFab</sup>
	9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	37,33±7,51 <sup>ABab</sup>	8,99±3,72 <sup>CDEFGab</sup>
29,1	0	47,00±1,12 <sup>Dc</sup>	467,91±18,81 <sup>Hb</sup>	38,78±0,59 <sup>Kh</sup>
	1	5,47±0,12 <sup>BCb</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	2	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	14,33±1,32 <sup>GHd</sup>
	3	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	6,27±4,40 <sup>ABCdb</sup>
	4	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	5	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,10±0,14 <sup>Aa</sup>
	6	5,96±0,56 <sup>Cb</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	19,04±1,59 <sup>Hlc</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	13,18±1,87 <sup>EFGHd</sup>
	9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	19,11±2,53 <sup>Hlc</sup>
	10	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	30,08±0,92 <sup>Jg</sup>
	11	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	24,24±0,42 <sup>IIf</sup>
	12	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	13,48±1,38 <sup>FGHd</sup>
	13	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	6,48±0,84 <sup>ABCDEb</sup>
14	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	8,48±0,43 <sup>CDEFGbc</sup>	

Continuación de la **Tabla A5.4.**

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
	15	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	11,17±1,02 <sup>CDEFGcd</sup>

Letras mayúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Letras minúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para muestras de un mismo DH.

Proteína determinada con el ensayo del ácido bicinconínico, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. A las muestras cuyo resultado fue 0 µg de proteína se les asignó el valor mínimo detectable por la técnica (2 µg).

DH: grado de hidrólisis.

Contenido de proteína, AAO y AAH (dilución 1/2) de las muestras de partida tratadas por centrifugación y ultrafiltración (WPH-CF):

-22,1% DH: 1185,61±33,91 µg, 10454,10±75,77 µM y 87,25±0,26%.

-29,1% DH: 1111,93±12,41 µg, 13572,64±951,11 µM y 95,49±2,80%.

Fuerza iónica del *buffer* fosfato 50 mM (pH 7) utilizado para eluir las muestras: baja: 0-0,3 M NaCl; media: 0,4-0,6 M NaCl; alta: 0,75-2,5 M NaCl:

-22,1% DH: FA 0 a 4; FA 5 a 6; FA 7 a 10.

-29,1% DH: FA 0 a 6; FA 7 a 9; FA 10 a 15.

**Tabla A5.5.** Contenido de proteína, actividad antioxidante (AAO) y actividad antihipertensiva (AAH) de las fracciones agrupadas (FA) obtenidas a partir del fraccionamiento de los hidrolizados con cromatografía de interacción hidrofóbica.

DH (%)	FA	Proteína (µg)	AAO (µM)	AAH (%)
22,1	0	57,18±1,61 <sup>Dc</sup>	522,24±34,16 <sup>Cc</sup>	44,27±0,38 <sup>Gc</sup>
	1	7,93±0,74 <sup>Bb</sup>	58,26±2,41 <sup>Bb</sup>	12,10±1,62 <sup>DEb</sup>
	2	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	12,00±0,76 <sup>Db</sup>
	3	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	4,21±0,27 <sup>Ba</sup>
	4	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	4,02±1,16 <sup>Ba</sup>
29,1	5	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	4,55±0,28 <sup>Ba</sup>
	0	38,93±0,37 <sup>Cc</sup>	526,97±64,19 <sup>Cb</sup>	45,96±1,34 <sup>Gc</sup>
	1	7,14±1,74 <sup>Bb</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,19±0,28 <sup>Aa</sup>
	2	2,45±1,55 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	15,31±1,78 <sup>EFd</sup>
	3	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	13,76±2,06 <sup>DEFd</sup>
	4	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	3,55±1,42 <sup>Bab</sup>
	5	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	6	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	7	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	8	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	15,24±2,21 <sup>DEFd</sup>
	9	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	8,05±2,25 <sup>Cc</sup>
	10	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	14,10±1,94 <sup>DEFd</sup>
	11	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	12	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	4,57±3,14 <sup>Bbc</sup>
	13	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>
	14	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	16,40±4,24 <sup>Fd</sup>
15	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	
16	2,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	0,00±0,00 <sup>Aa</sup>	

Letras mayúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).  
 Letras minúsculas diferentes, para cada característica analizada, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para muestras de un mismo DH.

Proteína determinada con el ensayo del ácido bicinconínico, utilizando albúmina sérica bovina como estándar. A las muestras cuyo resultado fue 0 µg de proteína se les asignó el valor mínimo detectable por la técnica (2 µg).

DH: grado de hidrólisis.

Contenido de proteína, AAO y AAH (dilución 1/2) de las muestras de partida tratadas por centrifugación y ultrafiltración (WPH-CF):

-22,1% DH: 1185,61±33,91 µg, 10454,10±75,77 µM y 87,25±0,26%.

-29,1% DH: 1111,93±12,41 µg, 13572,64±951,11 µM y 95,49±2,80%.

Fuerza iónica del *buffer* fosfato 50 mM (pH 7) utilizado para eluir las muestras: baja: 0-0,3 M NaCl; media: 0,4-0,6 M NaCl; alta: 0,75-2,5 M NaCl:

-22,1% DH: FA 3 a 5; FA 0 a 2; FA 0 a 2.

-29,1% DH: FA 15 y 16; FA 13 y 14; FA 0 a 12.

**Anexo 6. Resultados y discusión. Estudios de inmovilización**

**Tabla A6.1.** Proteína residual y actividad residual del sobrenadante durante la inmovilización en el tiempo de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® sobre partículas de quitosano activadas con glutaraldehído al 2%.

Tiempo de inmovilización (h)	Proteína residual (%)		Actividad residual (%)	
	<i>Alcalase</i> ®	<i>Flavourzyme</i> ®	<i>Alcalase</i> ®	<i>Flavourzyme</i> ®
0	100,00±5,11 <sup>d</sup>	100,00±1,89 <sup>g</sup>	100,00±5,52 <sup>g</sup>	100,00±4,67 <sup>f</sup>
1	54,21±0,78 <sup>c</sup>	91,78±1,21 <sup>f</sup>	68,22±1,08 <sup>f</sup>	69,63±0,86 <sup>e</sup>
2	50,18±4,77 <sup>c</sup>	75,38±1,16 <sup>e</sup>	48,38±2,62 <sup>e</sup>	54,20±11,65 <sup>d</sup>
3	29,25±3,27 <sup>b</sup>	73,92±2,46 <sup>e</sup>	32,57±4,49 <sup>d</sup>	39,27±4,65 <sup>c</sup>
4	27,19±0,41 <sup>b</sup>	60,83±0,01 <sup>d</sup>	26,40±1,76 <sup>c</sup>	23,03±1,33 <sup>b</sup>
12	7,87±1,56 <sup>a</sup>	42,11±0,39 <sup>c</sup>	8,48±0,50 <sup>b</sup>	1,09±0,28 <sup>a</sup>
24	6,44±0,52 <sup>a</sup>	20,19±0,18 <sup>b</sup>	4,04±0,01 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
48	5,52±0,81 <sup>a</sup>	7,36±0,42 <sup>a</sup>	2,69±0,07 <sup>ab</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
72	2,66±0,40 <sup>a</sup>	8,13±1,18 <sup>a</sup>	1,90±0,03 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>

Letras diferentes, dentro de cada columna, indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A6.2.** Proteína residual y actividad residual de los controles de inmovilización en el tiempo de *Alcalase*®.

Tiempo de inmovilización (h)	Proteína residual (%)		Actividad residual (%)	
	Control 1	Control 2	Control 1	Control 2
0	100,00±11,86 <sup>efg</sup>	100,00±2,08 <sup>efg</sup>	100,00±5,52 <sup>efgh</sup>	100,00±4,26 <sup>efgh</sup>
1	93,38±10,93 <sup>cde</sup>	108,56±1,24 <sup>efg</sup>	98,89±6,15 <sup>defgh</sup>	107,13±0,85 <sup>gh</sup>
2	111,09±11,01 <sup>fg</sup>	83,12±13,19 <sup>bcd</sup>	108,38±9,01 <sup>h</sup>	106,06±1,30 <sup>fgh</sup>
3	101,96±2,32 <sup>efg</sup>	96,75±7,18 <sup>def</sup>	103,14±7,48 <sup>efgh</sup>	96,18±2,83 <sup>def</sup>
4	115,98±12,33 <sup>g</sup>	78,74±3,54 <sup>bc</sup>	108,24±0,08 <sup>h</sup>	97,28±0,34 <sup>defg</sup>
12	83,18±5,69 <sup>bcd</sup>	69,39±8,57 <sup>b</sup>	88,97±0,66 <sup>d</sup>	69,63±7,36 <sup>c</sup>
24	80,36±3,69 <sup>bc</sup>	44,60±1,97 <sup>a</sup>	95,59±8,08 <sup>de</sup>	54,94±2,28 <sup>b</sup>
48	78,56±6,98 <sup>bc</sup>	43,87±0,67 <sup>a</sup>	77,49±8,29 <sup>c</sup>	43,05±3,27 <sup>a</sup>
72	70,71±3,31 <sup>b</sup>	72,08±9,78 <sup>b</sup>	68,04±2,11 <sup>c</sup>	43,85±1,97 <sup>a</sup>
<b>Factor A: Muestra (control 1 y 2)</b>		*		*
<b>Factor B: Tiempo de inmovilización</b>		*		*
<b>Interacción AB</b>		*		*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes, para cada parámetro, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Control 1: Solución enzimática preparada en *buffer* carbonato de sodio 100 mM (pH 9).

Control 2: Solución enzimática preparada en solución de glutaraldehído al 2%.

**Tabla A6.3.** Proteína residual y actividad residual de los controles de inmovilización en el tiempo de *Flavouryme*®.

Tiempo de inmovilización (h)	Proteína residual (%)		Actividad residual (%)	
	Control 1	Control 2	Control 1	Control 2
0	100,00±0,07 <sup>d</sup>	100,00±3,38 <sup>d</sup>	100,00±0,27 <sup>g</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
1	99,95±7,26 <sup>d</sup>	97,31±5,42 <sup>cd</sup>	93,85±1,01 <sup>f</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
2	98,92±8,27 <sup>d</sup>	94,37±4,57 <sup>bcd</sup>	86,29±1,42 <sup>e</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
3	99,95±6,90 <sup>d</sup>	95,07±6,61 <sup>cd</sup>	83,34±2,51 <sup>e</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
4	91,33±2,52 <sup>abcd</sup>	100,13±4,64 <sup>d</sup>	83,31±0,02 <sup>e</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
12	100,36±0,76 <sup>d</sup>	86,57±3,49 <sup>abc</sup>	76,86±7,78 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
24	96,27±4,79 <sup>cd</sup>	79,99±6,10 <sup>a</sup>	59,90±7,13 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
48	124,14±5,80 <sup>e</sup>	82,62±3,75 <sup>ab</sup>	64,61±3,31 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
72	128,07±11,54 <sup>e</sup>	91,78±4,36 <sup>abcd</sup>	52,71±3,31 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>
<b>Factor A: Muestra (control 1 y 2)</b>		*		*
<b>Factor B: Tiempo de inmovilización</b>		*		*
<b>Interacción AB</b>		*		*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes, para cada parámetro, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Control 1: Solución enzimática preparada en *buffer* fosfato de sodio 100 mM (pH 8).

Control 2: Solución enzimática preparada en solución de glutaraldehído al 2%.

**Anexo 7. Resultados y discusión. Caracterización bioquímica, funcional y cinética de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado inmovilizado**

**Tabla A7.1.** Actividad relativa de *Alcalase*® (pH 9) y *Flavourzyme*® (pH 8) en estado libre e inmovilizado, evaluada a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	Actividad relativa (%)			
	<i>Alcalase</i> ®		<i>Flavourzyme</i> ®	
	Libre	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada
30	23,48±0,26 <sup>a</sup>	23,95±0,69 <sup>a</sup>	24,63±5,35 <sup>b</sup>	37,68±0,45 <sup>c</sup>
40	46,05±0,67 <sup>c</sup>	37,88±0,12 <sup>b</sup>	81,63±1,19 <sup>g</sup>	71,56±1,54 <sup>f</sup>
45	57,81±0,33 <sup>f</sup>	46,20±0,58 <sup>e</sup>	93,23±2,01 <sup>hi</sup>	89,61±1,94 <sup>h</sup>
50	73,40±3,52 <sup>g</sup>	53,99±0,50 <sup>ef</sup>	100,00±3,15 <sup>j</sup>	100,00±2,00 <sup>j</sup>
55	84,38±3,33 <sup>h</sup>	73,45±1,13 <sup>g</sup>	55,22±2,55 <sup>d</sup>	97,47±0,47 <sup>ij</sup>
60	94,28±1,30 <sup>j</sup>	90,13±0,08 <sup>i</sup>	24,82±2,05 <sup>b</sup>	63,01±1,42 <sup>e</sup>
65	100,00±2,33 <sup>k</sup>	97,50±3,70 <sup>jk</sup>	-	-
70	95,88±3,04 <sup>j</sup>	100,00±3,24 <sup>k</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	37,88±0,65 <sup>c</sup>
75	49,11±2,39 <sup>cd</sup>	81,61±0,98 <sup>h</sup>	-	-
80	39,30±0,13 <sup>b</sup>	51,29±0,04 <sup>de</sup>	-	-
<b>Factor A</b>	NS		*	
<b>Factor B</b>	*		*	
<b>Interacción AB</b>	*		*	

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

NS: efecto no significativo ( $p > 0,05$ ).

Letras diferentes, para cada enzima, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Factor A: Condición (libre o inmovilizada).

Factor B: Temperatura.

**Tabla A7.2.** Actividad relativa de *Alcalase*® y *Flavourzyme*® en estado libre e inmovilizado, evaluada a distintos valores de pH.

pH	Actividad relativa (%)			
	<i>Alcalase</i> ®		<i>Flavourzyme</i> ®	
	Libre	Inmovilizada	Libre	Inmovilizada
4,0	1,13±0,02 <sup>a</sup>	3,42±0,01 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	26,82±1,33 <sup>e</sup>
6,0	40,19±2,47 <sup>c</sup>	33,12±0,37 <sup>d</sup>	44,66±4,78 <sup>g</sup>	17,88±0,94 <sup>cd</sup>
7,0	83,91±3,11 <sup>ij</sup>	57,16±0,21 <sup>f</sup>	64,81±1,30 <sup>h</sup>	100,00±3,30 <sup>l</sup>
7,5	81,21±2,86 <sup>hi</sup>	68,90±1,26 <sup>g</sup>	100,00±4,19 <sup>l</sup>	98,08±7,66 <sup>l</sup>
8,0	85,30±0,63 <sup>ij</sup>	100,00±0,03 <sup>m</sup>	70,47±1,88 <sup>i</sup>	86,51±0,74 <sup>k</sup>
8,5	91,96±2,33 <sup>kl</sup>	88,52±1,91 <sup>jk</sup>	48,09±2,98 <sup>g</sup>	77,40±0,99 <sup>j</sup>
9,0	100,00±5,67 <sup>m</sup>	84,67±4,26 <sup>ij</sup>	22,60±4,07 <sup>de</sup>	44,88±0,54 <sup>g</sup>
9,5	96,90±9,99 <sup>lm</sup>	77,48±1,72 <sup>h</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	37,87±0,24 <sup>f</sup>
10,0	76,53±1,13 <sup>h</sup>	67,11±0,01 <sup>g</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	33,38±1,70 <sup>f</sup>
11,0	19,49±0,34 <sup>c</sup>	27,66±0,11 <sup>d</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	13,63±0,33 <sup>bc</sup>
12,0	4,35±0,21 <sup>a</sup>	12,35±0,10 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	10,21±0,60 <sup>b</sup>
<b>Factor A</b>		*		*
<b>Factor B</b>		*		*
<b>Interacción AB</b>		*		*

Las últimas filas muestran los resultados de ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo ( $p < 0,05$ ).

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Factor A: Condición (libre o inmovilizada).

Factor B: pH.

Temperatura de reacción: 65°C para *Alcalase*® libre, 70°C para *Alcalase*® inmovilizada y 50°C para *Flavourzyme*® libre e inmovilizada.

**Tabla A7.3.** Actividad relativa de *Alcalase*® en estado inmovilizado, pre-incubada a distintas temperaturas y tiempos (pH 8).

Tiempo (min)	Actividad relativa (%)			
	60°C	65°C	70°C	80°C
0	100,00±0,80 <sup>n̄</sup>	100,00±0,80 <sup>n̄</sup>	100,00±0,80 <sup>n̄</sup>	100,00±0,80 <sup>n̄</sup>
30	80,72±0,92 <sup>n</sup>	58,00±0,99 <sup>l</sup>	42,49±0,08 <sup>i</sup>	9,33±0,36 <sup>c</sup>
60	71,06±0,95 <sup>m</sup>	47,69±0,80 <sup>j</sup>	34,29±0,04 <sup>g</sup>	7,95±0,24 <sup>b</sup>
240	51,01±0,19 <sup>k</sup>	24,75±0,26 <sup>f</sup>	15,59±0,51 <sup>d</sup>	5,86±0,31 <sup>a</sup>
720	39,43±0,22 <sup>h</sup>	18,68±0,02 <sup>e</sup>	8,97±0,14 <sup>bc</sup>	6,34±0,15 <sup>a</sup>
<b>Factor A: Tiempo</b>				*
<b>Factor B: Temperatura</b>				*
<b>Interacción AB</b>				*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A7.4.** Actividad relativa de *Flavourzyme*® en estado inmovilizado, pre-incubada a distintas temperaturas y tiempos (pH 7,5).

Tiempo (min)	Actividad relativa (%)			
	35°C	40°C	45°C	50°C
0	100,00±0,12 <sup>m</sup>	100,00±0,12 <sup>m</sup>	100,00±0,12 <sup>m</sup>	100,00±0,12 <sup>m</sup>
30	40,63±0,10 <sup>l</sup>	41,80±2,03 <sup>l</sup>	31,19±0,43 <sup>j</sup>	23,18±0,00 <sup>h</sup>
60	33,06±0,47 <sup>k</sup>	29,52±0,85 <sup>i</sup>	21,46±0,53 <sup>g</sup>	13,02±0,37 <sup>f</sup>
240	20,39±0,16 <sup>g</sup>	10,74±0,45 <sup>e</sup>	8,89±0,26 <sup>d</sup>	4,08±0,00 <sup>b</sup>
720	13,33±0,16 <sup>f</sup>	6,93±0,35 <sup>c</sup>	5,22±0,07 <sup>b</sup>	1,16±0,32 <sup>a</sup>
<b>Factor A: Tiempo</b>				*
<b>Factor B: Temperatura</b>				*
<b>Interacción AB</b>				*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A7.5.** Actividad relativa de *Alcalase*® en estado inmovilizado, pre-incubada a distintos valores de pH y tiempos (65°C).

Tiempo (min)	Actividad relativa (%)				
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
0	100,00±0,80 <sup>r</sup>	100,00±0,80 <sup>r</sup>	100,00±0,80 <sup>r</sup>	100,00±0,80 <sup>r</sup>	100,00±0,80 <sup>r</sup>
30	45,91±0,11 <sup>n</sup>	52,70±0,01 <sup>o</sup>	58,00±0,99 <sup>q</sup>	56,66±0,29 <sup>p</sup>	34,56±0,36 <sup>k</sup>
60	32,70±0,00 <sup>j</sup>	37,98±0,05 <sup>l</sup>	47,69±0,80 <sup>n̄</sup>	44,49±0,50 <sup>m</sup>	25,99±0,16 <sup>i</sup>
240	12,73±0,44 <sup>d</sup>	15,83±0,68 <sup>e</sup>	24,75±0,26 <sup>h</sup>	22,58±0,22 <sup>g</sup>	11,29±0,06 <sup>c</sup>
720	9,17±0,16 <sup>b</sup>	11,17±0,44 <sup>c</sup>	18,68±0,02 <sup>f</sup>	14,83±0,10 <sup>e</sup>	6,96±0,08 <sup>a</sup>
<b>Factor A: Tiempo</b>					*
<b>Factor B: pH</b>					*
<b>Interacción AB</b>					*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).

**Tabla A7.6.** Actividad relativa de *Flavourzyme*® en estado inmovilizado, pre-incubada a distintos valores de pH y tiempos (35°C).

Tiempo (min)	Actividad relativa (%)				
	pH 5	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5
0	100,00±0,12 <sup>o</sup>	100,00±0,12 <sup>o</sup>	100,00±0,12 <sup>o</sup>	100,00±0,12 <sup>o</sup>	100,00±0,12 <sup>o</sup>
30	26,69±0,18 <sup>i</sup>	57,11±0,29 <sup>n̄</sup>	40,17±0,56 <sup>m</sup>	34,26±0,32 <sup>l</sup>	30,62±1,15 <sup>k</sup>
60	34,12±0,47 <sup>l</sup>	42,64±0,72 <sup>n</sup>	33,06±0,47 <sup>l</sup>	24,62±0,66 <sup>h</sup>	18,64±0,49 <sup>f</sup>
240	8,80±1,19 <sup>b</sup>	29,21±1,28 <sup>j</sup>	20,39±0,16 <sup>g</sup>	16,32±0,10 <sup>e</sup>	11,31±0,24 <sup>c</sup>
720	7,02±0,83 <sup>a</sup>	19,59±0,02 <sup>fg</sup>	13,33±0,16 <sup>d</sup>	8,46±1,21 <sup>b</sup>	7,09±1,09 <sup>a</sup>
<b>Factor A: Tiempo</b>					*
<b>Factor B: pH</b>					*
<b>Interacción AB</b>					*

Las últimas filas muestran los resultados del ANOVA de múltiples vías.

\*: efecto significativo (p<0,05).

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05).