

## MODELAMIENTO DE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DEL PLASMA BOVINO

OMAR ALFREDO FIGUEROA\*  
JOSÉ ÉDGAR ZAPATA\*\*  
GAIL ALBEIRO GUTIÉRREZ\*\*\*

### RESUMEN

Se utilizó un modelo cinético para estudiar la velocidad de reacción en la hidrólisis de proteínas de plasma de bovino con alcalasa 2,4 L en un reactor batch. Se estudió la influencia de variables como la concentración inicial de sustrato y enzima sobre el grado de hidrólisis y se determinaron los parámetros cinéticos de la ecuación de velocidad, analizando su relación con las variables de trabajo. Se ajustó un modelo cinético de orden cero y desactivación enzimática por sustrato, de segundo orden, así como la relación directa entre la fracción enzima-sustrato y la tasa de formación de productos de hidrólisis.

**PALABRAS CLAVE:** hidrolizados proteicos; hidrólisis enzimática; cinética enzimática; modelos bioquímicos.

---

\* Ingeniero Agroindustrial, Universidad Popular del Cesar; Magíster (c) en Ciencias Farmacéuticas: Alimentos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. omfimo22@gmail.com

\*\* Ingeniero Químico, Universidad de Antioquia; Doctor en Biotecnología, Universidad de Granada, España. Docente de Planta, Departamento de Alimentos, Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. jedgar\_4@yahoo.es

\*\*\*Ingeniero Mecánico, Universidad Industrial de Santander; Doctor en Ingeniería, Universidad Pontificia Bolivariana, Sede Medellín. Docente, Universidad Popular del Cesar. Valledupar, Colombia. gailgutierrez@unicesar.edu.co

## MODELING OF THE KINETICS OF ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BOVINE PLASMA PROTEINS

### ABSTRACT

A kinetic model was used to study the reaction rate of hydrolysis of bovine plasma proteins and alcalase 2.4 L, in a batch reactor. The influence of variables, such as the concentration of initial enzyme substrate and the degree of hydrolysis was studied, and kinetic parameters of the rate equation were determined by analyzing its relationship with the work variables. A zero-order kinetic model and enzyme deactivation by substrate was found, as well as the direct relationship between the fraction of enzyme-substrate and the rate of formation of hydrolysis products.

KEY WORDS: protein hydrolysates; enzymatic hydrolysis; enzymatic kinetics; biochemical models.

## MODELAÇÃO DA CINÉTICA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DO PLASMA BOVINO

### RESUMO

Utilizou-se um modelo cinético para estudar a velocidade de reação na hidrólise de proteínas de plasma de bovino com alcalasa 2,4 L em um reator batch. Estudou-se a influência de variáveis como a concentração inicial de substrato e enzima sobre o grau de hidrólise e determinaram-se os parâmetros cinéticos da equação de velocidade, analisando sua relação com as variáveis de trabalho. Ajustou-se um modelo cinético de ordem zero e desativação enzimática por substrato, de segunda ordem, bem como a relação direta entre a fração enzima-substrato e a taxa de formação de produtos de hidrólise.

PALAVRAS-CÓDIGO: hidrolizados proteicos; hidrólise enzimática; cinética enzimática; modelos bioquímicos.

### 1. INTRODUCCIÓN

La sangre bovina es un subproducto de la industria cárnica con un importante valor biológico, representado en su contenido de proteínas, lo que la convierte en una buena fuente de aminoácidos, cuyo uso como ingrediente, en especial la fracción plasmática, se ha extendido en alimentación humana y animal, en aplicaciones como la formulación de embutidos, pudines, panes, galletas, etc. (Rodas *et al.*, 1998). No obstante, la mayor parte de la sangre producida en el sacrificio de animales se vierte a las fuentes de agua, contribuyendo al daño del medio ambiente (Hyun y Park, 2002).

Los hidrolizados de proteínas se han utilizado en muchos procesos alimentarios, gracias a sus propiedades funcionales, como mayor capacidad de agitación, dispersión y elevada solubilidad (Ramos *et al.*, 2006; Dávila *et al.*, 2007; Benítez, Ibarz y Pagan, 2008). Desde el punto de vista de la nutrición, las proteínas y péptidos procedentes de alimentos se están empleando con el fin de mejorar funciones biológicas (Möller *et al.*, 2008; Bernardini *et al.*, 2010), pues los péptidos obtenidos por hidrólisis son capaces de ejercer efectos biológicos específicos (Martínez y Martínez, 2006). Tal es el caso de hidrolizados de plasma a los que se les ha reportado actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la



angiotensina (ACE), actividad antigenotóxica (reducción de daños en el ADN) (Hyun y Park, 2002) y actividad antioxidante (Liu *et al.*, 2010). Por otro lado, han sido aislados péptidos de hemoglobina bovina con propiedades antimicrobianas (Daoud, Dubois-Delval y Bors-Dodita, 2005; Nedjar *et al.*, 2006).

Debido al uso potencial del plasma y otras proteínas de la sangre, existe hoy día gran interés por modelar el comportamiento de sistemas que involucran reacciones de hidrólisis enzimática, con el fin de dimensionar equipos industriales, pronosticar comportamientos dinámicos, controlar tiempos de proceso y otras variables cinéticas (Arantes, 2008). Es importante resaltar que la optimización de estos procesos depende del comportamiento cinético, que puede llegar a ser muy complejo para sistemas con sustratos proteicos, más aun cuando se tienen varias proteínas en el mismo sistema reaccionante (Guadix *et al.*, 2000). En este sentido, un modelo muy simple es insuficiente para representar un proceso, y uno muy complejo se hace poco práctico (Márquez y Vázquez, 1999). Unos modelos cinéticos para sistemas batch que explican la velocidad de hidrólisis de caseínas (Camacho *et al.*, 1993), lactoalbúminas (González-Tello *et al.*, 1994), hemoglobina bovina (Márquez y Vázquez, 1999) y sustratos de origen vegetal (Márquez y Fernández, 1993) se han probado con éxito, generando información básica para la optimización de procesos.

Considerando que las reacciones enzimáticas de proteínas tienen cierto grado de complejidad, se han venido estudiando modelos cinéticos de agrupamiento que contemplan la distribución de pesos moleculares de los productos de reacción (Shi, He y Qi, 2005), así como sistemas discontinuos de separación empleando membranas, a fin de reducir los inconvenientes con las inhibiciones enzimáticas por producto (Cheison, Wang y Xu, 2006; Prieto, Guadix y Guadix, 2008; Trusek-Holownia, 2008).

En el presente trabajo se aborda el modelado de la hidrólisis de proteínas de plasma bovino, cuya exploración, desde la perspectiva de los modelos

de hidrólisis, ha sido poco documentada. Se realizó un estudio cinético de la hidrólisis enzimática de proteínas de dicho sustrato, por medio del análisis de las curvas de hidrólisis bajo diferentes condiciones de trabajo, y se encontró que es posible ajustar el comportamiento descrito a un modelo matemático basado en una cinética de reacción de orden cero, desactivación enzimática de segundo orden e inhibición irreversible inicial de una fracción de la enzima, pudiéndose determinar de esta forma los parámetros cinéticos del mecanismo de reacción propuesto. Este estudio permitió obtener información útil para predecir y manipular el comportamiento de las variables del proceso, lo que podría servir para dirigir la hidrólisis enzimática hacia la obtención de fracciones peptídicas de interés biológico.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

Los reactivos usados en el estudio fueron de grado analítico y los métodos empleados fueron estandarizados *a priori*. El plasma fue suministrado por la empresa Yeruvá S. A., en la ciudad de Esperanza, provincia de Santa Fe, República Argentina. La presentación del producto fue líquida, con un contenido proteico de 6,5 %. A este se le realizaron controles microbiológicos de mohos y levaduras, coliformes totales y mesófilos, en el momento de la recepción. Para la hidrólisis de proteínas, se utilizó alcalasa 2,4 L grado alimenticio (actividad específica de  $2,45 \pm 0,07$  AU/g), cuya actividad se verificó con el método de Takami, Akiba y Horikoshi (1989) modificado; es una enzima proteolítica producida por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*. El componente principal de la enzima, subtilisina A (subtilisina Carlsberg), es una endoproteasa. Las condiciones óptimas para alcalasa 2,4 L son temperaturas entre 55 °C y 70 °C, dependiendo del tipo de sustrato, y valores de pH entre 6,5 y 8,5.

## 2.2 Sistema de reacción

Se usó un reactor de vidrio con camisa de circulación de agua para regulación de la temperatura y capacidad volumétrica de 1 L. El control de pH y el registro de temperatura se hicieron con un electrodo combinado de vidrio LL con diafragma esmerilado fijo (temperatura entre 0-80 °C), conectado a un titulador automático (Titrand 842) marca Metrohm, operado por computador (software tiamo 1.2.1). El sistema de reacción se mantuvo en agitación constante usando un agitador magnético 801 (Metrohm), con variación de velocidad. La temperatura en el sistema fue de 55 °C, el pH de 8 y la agitación de 200 rpm.

## 2.3 Métodos analíticos

### 2.3.1 Análisis del contenido proteico

La concentración de proteínas del plasma recibido fue determinada por el método de Bradford (1976). La curva patrón se construyó empleando albúmina bovina, referencia A7030 de Sigma-Aldrich. Las mediciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec de Shimadzu. La absorbancia a temperatura ambiente se midió a 595 nm (Trusek-Holownia, 2008).

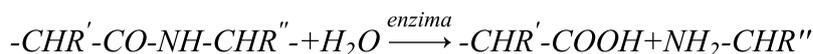
### 2.3.2 Seguimiento de la reacción de hidrólisis

Unos estudios previos de hidrólisis con alcalasa 2,4 L y hemoglobina bovina revelan que concentraciones iniciales de sustratos del orden de 1-10

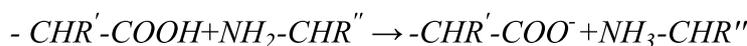
g/L de proteína presentan buen comportamiento respecto a la velocidad de formación de péptidos (Márquez y Vázquez, 1999). El contenido de proteínas del plasma se varió entre concentraciones de 4, 6 y 8 g/L, y fue hidrolizado con concentraciones de enzima de 2, 2,5 y 3 % en peso. El pH y la temperatura en el reactor se ajustaron con base en los valores óptimos de trabajo recomendados por el proveedor de la enzima (alcalasa 2,4 L), es decir, 8,0 y 55 °C respectivamente. Los ensayos de hidrólisis con cada relación enzima-sustrato fueron efectuados por duplicado. Cada ensayo tuvo una duración total de una hora, tomando registros del grado de hidrólisis (GH) cada 5 min.

La reacción a pH alcalino se observó para la determinación del GH, expresado como la relación entre el número de enlaces peptídicos cedidos en la hidrólisis ( $h$ ) y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa por unidad de peso ( $h_0$ ). Para este caso se empleó un valor reportado para proteínas de la sangre de  $h_0$  de 8,3  $equ/kg$  (Adler-Nissen, 1986). El método empleado para la determinación del grado de hidrólisis es el de valoración del protón o método del pH-estado. Consiste en mantener constante el pH del medio de reacción con adición de una solución básica (hidróxido de sodio 0,1 N), pues a medida que la hidrólisis avanza en medio alcalino, el grupo carboxilo terminal se disocia por completo y los protones formados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonación de los grupos  $\alpha$ -amino liberados. La base agregada para mantener constante el pH neutraliza únicamente los protones que son sustituidos por el catión de la base (Guadix, 2002).

En la hidrólisis de un enlace amido a pH alcalino, se siguen las siguientes etapas (Guadix, 2002):

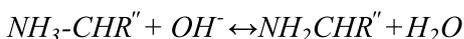


El grupo carboxilo terminal se disocia por completo:





La base agregada neutraliza los protones:



Luego este consumo de base puede relacionarse con el GH según la ecuación 1 (Márquez y Vázquez, 1999).

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

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

Donde  $B$  = volumen consumido de base (en litros),  $M_p$  = masa de la proteína (en kg),  $NB$  = normalidad de la base (eqv/L).

En 1b,  $\alpha$  es el grado de disociación de los grupos  $\alpha-NH_2$  (grupos aminos liberados en la reacción).

Para la estimación del promedio del grado de disociación de los grupos  $\alpha-NH_2$  liberados en la reacción, es necesario conocer el valor del  $pK$  medio y establecer de esta forma la relación entre el consumo de base y el grado de hidrólisis.

En la tabla 1, se muestran los valores del grado de disociación de proteínas en función del  $pH$  y la temperatura de reacción (Adler-Nissen, 1986).

**Tabla 1.** Valores de  $\alpha$  para distintas temperaturas y  $pH$  (Adler-Nissen, 1986)

$T$ (°C)	$pH$	$\alpha$
50	7,5	0,71
50	8,0	0,89
60	7,5	0,80
60	8,0	0,93

## 2.4 Modelo matemático

Se propuso un modelo matemático basado en el mecanismo de acción enzimática (González-Tello *et al.*, 1994), que establece una relación exponencial

entre la velocidad de la reacción, la concentración inicial de sustrato ( $S_0$ ) y de enzima ( $e_0$ ) con dos parámetros de ajuste  $a$  y  $b$  (véase ecuación 2), que fueron determinados con la función "lsqcurvefit" del "toolbox" de MATLAB, la cual resuelve problemas de ajuste de datos de curvas no lineales.

$$\frac{d(GH)}{dt} = a \exp [-b(GH)] \quad (2)$$

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 3.1 Modelo cinético

Los resultados obtenidos al estudiar el comportamiento del GH con respecto al tiempo, a diferentes concentraciones iniciales de enzima y de proteína, se muestran en las figuras 1 y 2, en las cuales se puede observar que al principio de la reacción el GH aumenta con el tiempo y luego tiende a valores constantes, que son directamente proporcionales a  $e_0$  e inversamente a  $S_0$ .

Algunos autores (González-Tello *et al.*, 1994; Márquez y Vázquez, 1999) han indicado que en la hidrólisis enzimática de proteínas, cuando se tienen curvas de declinación exponencial de la  $dGH/dt$  en función del tiempo, se puede ajustar un modelo de la forma de la ecuación 2 para el estudio cinético de la reacción, tal como se muestra en la figura 3, donde se pone en evidencia la disminución exponencial de la velocidad de la reacción ( $d(GH)/dt$ ) con el  $GH$ .

Por otro lado, el  $GH$  de la reacción aumenta cuando se trabaja a concentraciones iniciales más altas de enzima (véase figura 1), lo cual es un comportamiento típico en cinética enzimática de proteínas (He, Qi y He, 2002), debido a que la reacción de hidrólisis está ligada a la formación del complejo enzima-sustrato, que a su vez depende de la concentración de la enzima activa.

Se alcanzaron en este caso porcentajes de hidrólisis superiores al 12 % en una hora de reacción, con una relación enzima-sustrato de 2 % (w/w),

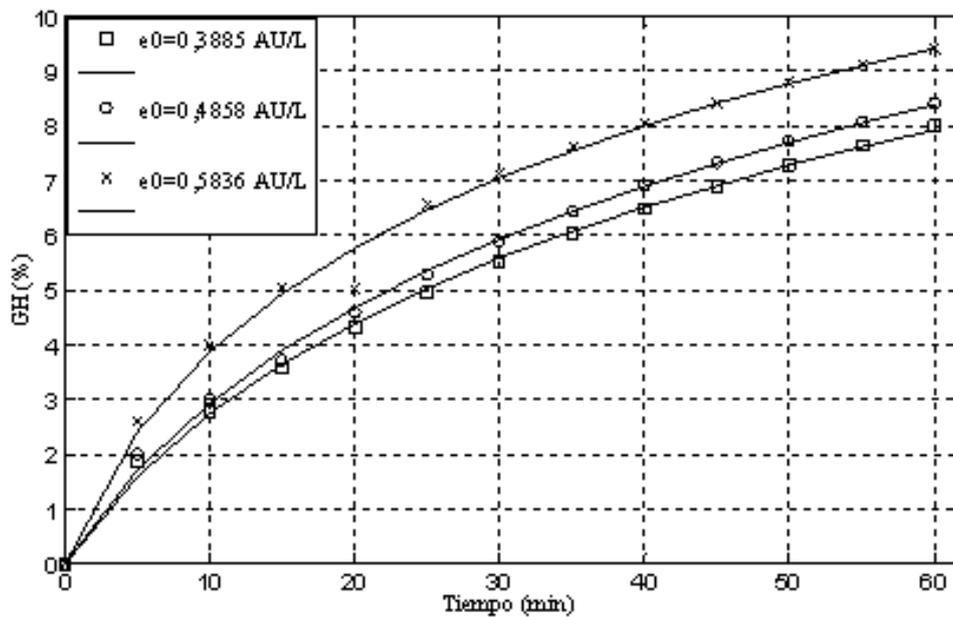


Figura 1. Comportamiento del GH con el tiempo a  $pH = 8,0$ ,  $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $S_0 = 8\text{ g/L}$  y  $e_0$  variable

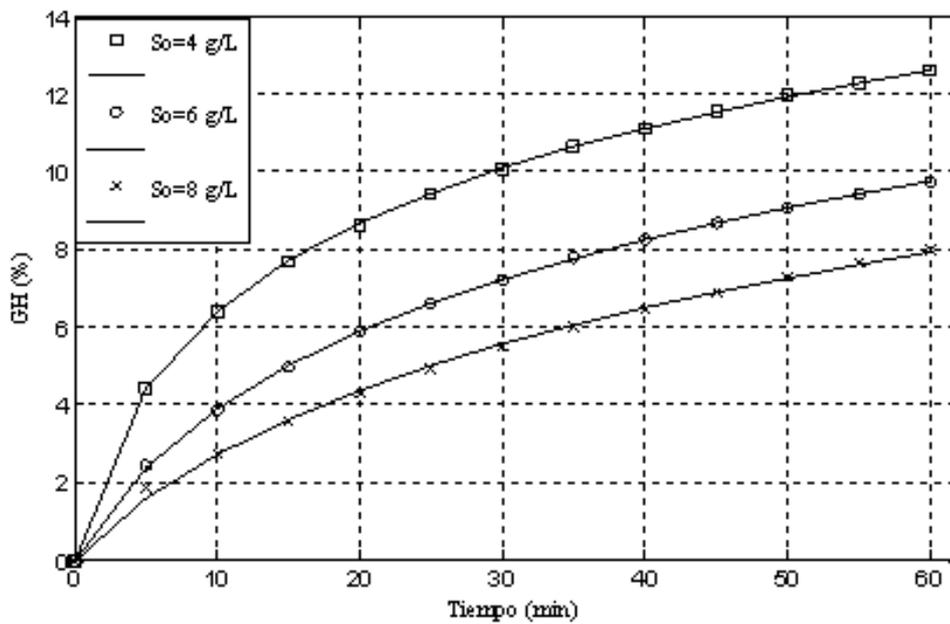
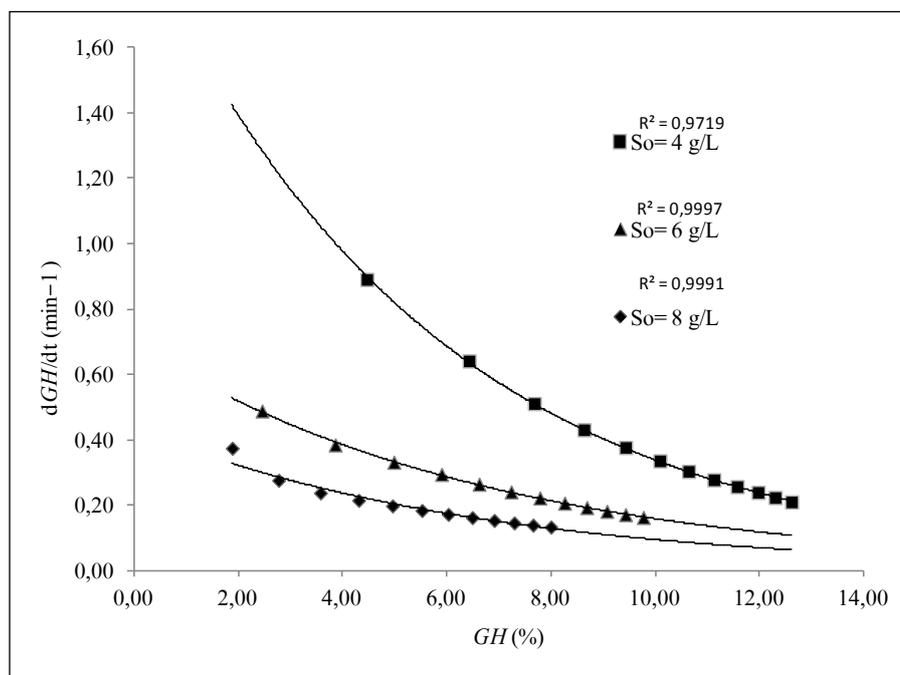


Figura 2. Comportamiento del GH con el tiempo a  $pH = 8,0$ ,  $T = 55\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $e_0 = 0,3885\text{ AU/L}$  y  $S_0$  variable



**Figura 3.** Disminución de  $dGH/dt$  con el  $GH$  para el sistema plasma bovino-alcalasa 2,4 L a diferentes  $S_0$  y  $e_0 = 0,3885$  AU/L,  $pH = 8,0$ ,  $T = 55$  °C

mientras que los rendimientos inferiores se registran con concentraciones menores de enzima (véase figura 1). Unas investigaciones anteriores (González-Tello *et al.*, 1994; Márquez y Vázquez, 1999; Qi y He, 2006) indican que la disminución en la tasa de hidrólisis de la reacción responde, por lo general, a tres factores: (a) Disminución en la concentración de enlaces peptídicos susceptibles a la hidrólisis por las proteasas, (b) posible inhibición de las enzimas causada por el sustrato de hidrólisis; (c) desnaturalización térmica de la enzima (González-Tello *et al.*, 1994).

Analizando las figuras 1 y 2, para todos los niveles de enzima y sustrato hidrolizados, se observa la tendencia del grado de hidrólisis hacia valores límites distintos, por lo que es claro que el factor controlante en la velocidad no es la disminución de enlaces peptídicos disponibles. Por otro lado, el fenómeno de desactivación enzimática demostró ser influyente en la disminución de la tasa de hidrólisis.

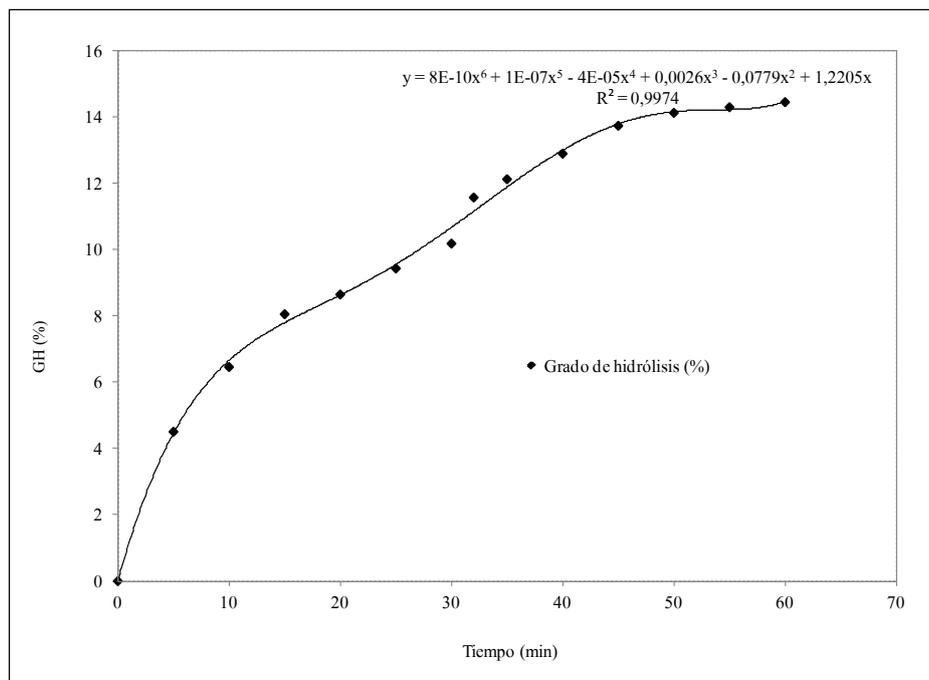
Esto se prueba de forma experimental, adicionando enzima fresca a un hidrolizado después de 30 minutos de reacción, al producirse un aumento notable en el grado de hidrólisis, lo que pone en evidencia el fenómeno de desactivación indicado, como se observa en la figura 4.

Se considera que la velocidad de hidrólisis a  $pH$  y temperatura constantes está dada por la ecuación 3 (González-Tello *et al.*, 1994):

$$r = S_0 \frac{d(GH)}{dt} = F(S_0, GH) * e \quad (3)$$

Separando variables e integrando la ecuación 3, para el caso en que no hay desnaturalización enzimática (González-Tello *et al.*, 1994):

$$\int_0^{GH} \frac{d(GH)}{F(S_0, GH)} = e_0 * t \quad (4)$$



**Figura 4.** Efecto de la adición de enzima fresca (alcalasa 2,4 L) durante el proceso de hidrólisis de plasma a  $pH = 8,0$ ,  $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $e_0 = 0,3885\text{ AU/L}$  y  $S_0 = 4\text{ g/L}$ .

De la misma manera, la expresión integrada para el caso en que se presente inactivación enzimática de segundo orden está dada por (5) (González-Tello *et al.*, 1994):

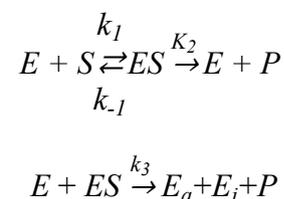
$$\int_0^{GH} \frac{d(GH)}{F(S_0, GH)} = \frac{1}{k_d} \ln(1 + k_d * e_0 * t) \quad (5)$$

Como puede verse en las ecuaciones 3 y 5, existe una relación directa entre el grado de hidrólisis y el producto  $e_0 * t$ , por lo que es posible decir que, para el caso de los experimentos realizados, la desactivación es de segundo orden, lo cual puede corroborarse con los resultados de la figura 5, donde se muestra que los datos de  $GH$  a igual  $S_0$  y distintas concentraciones de enzima inicial siguen la misma línea.

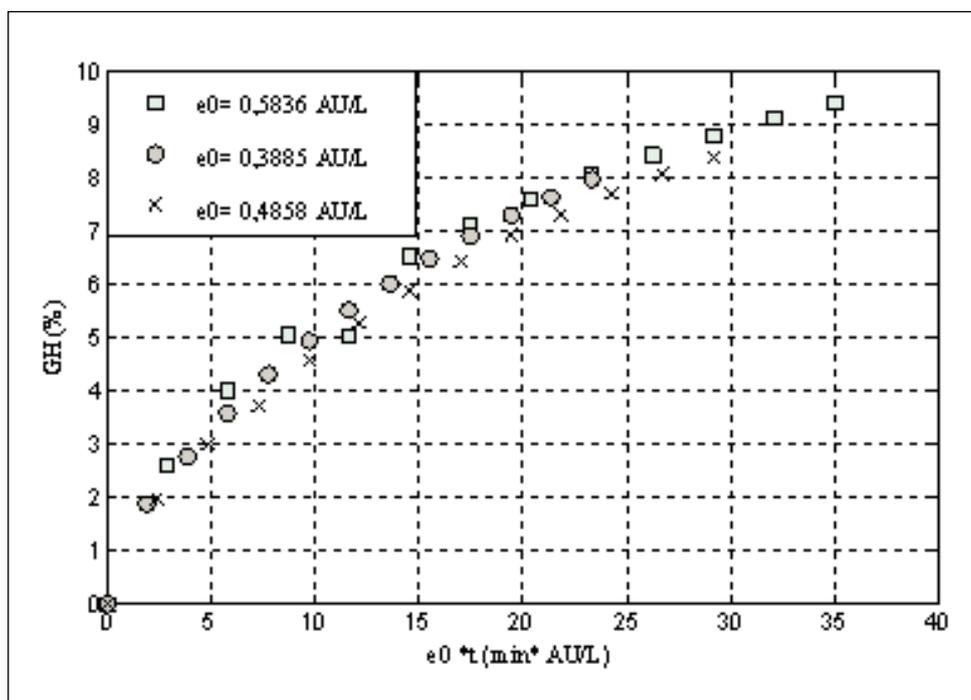
Por otra parte, una inactivación enzimática por el sustrato en el rango de concentraciones estimadas no se considera, puesto que los valores

registrados en los parámetros  $a$  y  $b$ , para distintas concentraciones de  $e_0$  y  $S_0$ , no concuerdan con el comportamiento esperado en el caso de adicionar al mecanismo este efecto inhibitor.

Estudios anteriores sugieren que un modelo de la forma de la ecuación 2 puede ser explicado suponiendo una hidrólisis enzimática de orden cero, simultánea con una desnaturalización de la enzima de segundo orden, como lo muestra el siguiente mecanismo (Márquez y Vázquez, 1999).



Donde  $E$ ,  $S$  y  $P$  representan la concentración de enzima, sustrato y producto, respectivamente.



**Figura 5.** Influencia de la concentración inicial de enzima por el tiempo en el GH, pH = 8,0, T = 55 °C, S<sub>0</sub> = 8 g/L

ES es el complejo enzima sustrato.

$$e = E + ES \quad (8)$$

E<sub>a</sub> y E<sub>i</sub> indican la concentración de enzima activa e inactiva en la reacción.

Luego las ecuaciones cinéticas para la formación de producto y para la etapa de desactivación enzimática son:

$$r = s_0 \frac{d(GH)}{dt} = k_2 [ES] \quad (6)$$

$$-\frac{de}{dt} = k_3 [E][ES] \quad (7)$$

Donde k<sub>2</sub> es la constante cinética de velocidad de formación de productos, k<sub>3</sub> es la constante de desactivación enzimática.

Teniendo en cuenta que la enzima interviene como catalizador del sistema, la concentración de enzima en todo momento resulta de:

Se sugiere la presencia de un inhibidor irreversible en el sustrato, que bien puede estar presente o formarse en la reacción de hidrólisis. Puede estar asociado a inhibidores α-AT presentes en la sangre humana y bovina (Beatty, Bieth y Travis, 1980) o inhibidores similares a estos, como los encontrados por Weber y Nielsen en matrices lácteas (Weber y Nielsen, 1991).

Esta hipótesis sugiere que parte de la enzima inicial se liga al inhibidor, modificando la concentración de enzima inicial disponible de manera instantánea, en la forma que se muestra en (9) (González-Tello et al., 1994):

$$E_{0act} = e_0 - BS_0 \quad (9)$$

Donde  $B \cdot S_0$  es la fracción de sustrato ligada al inhibidor y  $E_{0act}$  es la concentración de enzima inicial real activa en el sistema, disponible para la reacción. Según la aproximación de Briggs-Haldane (Tzafirri y Edelman, 2007), la constante de Michaelis-Menten  $K_m$  es:

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_2}{K_1} \quad (10)$$

Un balance de masa en el estado estacionario para el complejo  $ES$  indica que

$$|ES| = \frac{|E||S|}{K_m} \quad (11)$$

Sustituyendo la ecuación 11 en la (8) y suponiendo que la concentración de sustrato  $[S] = S_0$  y  $K_m \ll S_0$ :

$$|E| = \frac{K_m e}{S_0} \quad (12)$$

De las ecuaciones (6), (7) y (12) se obtiene por integración una expresión para  $e$ , donde el límite inferior de integración es la enzima inicial realmente activa  $E_{0act}$ :

$$e = E_{0act} \exp \left[ -\frac{K_3 K_m}{K_2} (GH) \right] \quad (13)$$

Entonces una ecuación de velocidad para el sistema puede expresarse como sigue:

$$r = s_0 \frac{d(gh)}{dt} = k_2 (e_0 - BS_0) \exp \left[ -\frac{K_3 K_m}{K_2} (GH) \right] \quad (14)$$

Es decir, llega a un modelo general de la forma de la ecuación 2, obteniéndose para  $a$  y  $b$  las siguientes expresiones:

$$a = k_2 [(e_0/S_0) - B] \quad (15)$$

$$b = \frac{k_3 k_m}{k_2} \quad (16)$$

### 3.2 Determinación de los parámetros cinéticos

Los datos obtenidos en los ensayos experimentales se ajustaron a un modelo general de la forma de la ecuación 2. El ajuste del modelo con los datos experimentales fue satisfactorio y los parámetros  $a$  y  $b$  estimados están de acuerdo con el mecanismo propuesto (tabla 2).

Se aprecia que los valores de  $a$  aumentan con la relación  $e_0/S_0$ , mientras que los valores del parámetro  $b$  permanecen en torno a un cierto valor, para el rango de concentración de sustrato y enzima evaluados, con un promedio de  $(0,255 \pm 0,038) \text{ min}^{-1}$ .

**Tabla 2.** Valores del parámetro  $a$  evaluado y recalculado  $a_{rec}$  a distintas relaciones enzima-sustrato con su correspondiente coeficiente  $R^2$

$[e_0]/[S_0]$ (AU/g)	$a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$	$a_{recalculado}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$R^2$
0,036	0,072	0,9999	0,066	0,9995
0,049	0,380	0,9992	0,414	0,9962
0,061	0,413	0,9992	0,466	0,9957
0,065	0,639	0,9997	0,654	0,9998
0,073	0,657	0,9966	0,698	0,9875
0,097	1,652	0,9998	1,578	0,9992



Este comportamiento concuerda con reportes de literatura previos sobre hidrólisis enzimática de proteínas de la sangre (Márquez y Vázquez, 1999). Los valores de  $a$  fueron recalculados con la magnitud promedio del parámetro  $b$  y analizados a la luz de la variación de la relación enzima-sustrato, tal como se muestra en la tabla 2.

Cuando los valores de  $a_{rec}$  se grafican contra  $e_0/S_0$ , es posible estimar la constante de formación de producto  $k_2$  y la constante  $B$  de la ecuación 15 (ver figura 6).

De la misma manera, una representación gráfica del producto de los parámetros  $ab$  contra  $(e_0/S_0 - B)$  en una línea que pasa por el punto (0,0) permite la determinación del producto de las constantes  $k_3k_m$  (ver figura 7), que en el mecanismo propuesto equivale a la constante de desactivación enzimática de segundo orden de la reacción ( $k_d$ ), como se muestra en la siguiente expresión:

$$-\frac{de}{dt} = k_3k_m \frac{e^2}{S_0} \quad (17)$$

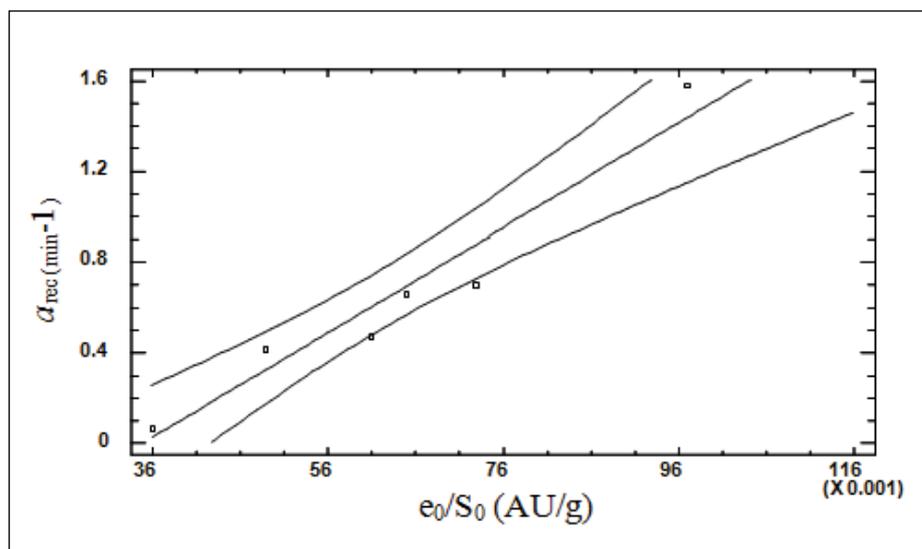
Donde  $k_3k_m = k_d$ , constante cinética de desactivación.

Los valores de los parámetros cinéticos calculados para el sistema alcalasa 2,4 L-plasma bovino son:  $K_2$  (g/AU\*min) = 22,940;  $B$  (AU/g) = 0,035 con  $R^2=0,9329$  y  $K_d$  (g/AU\*min) = 5,848 con  $R^2=0,9386$ .

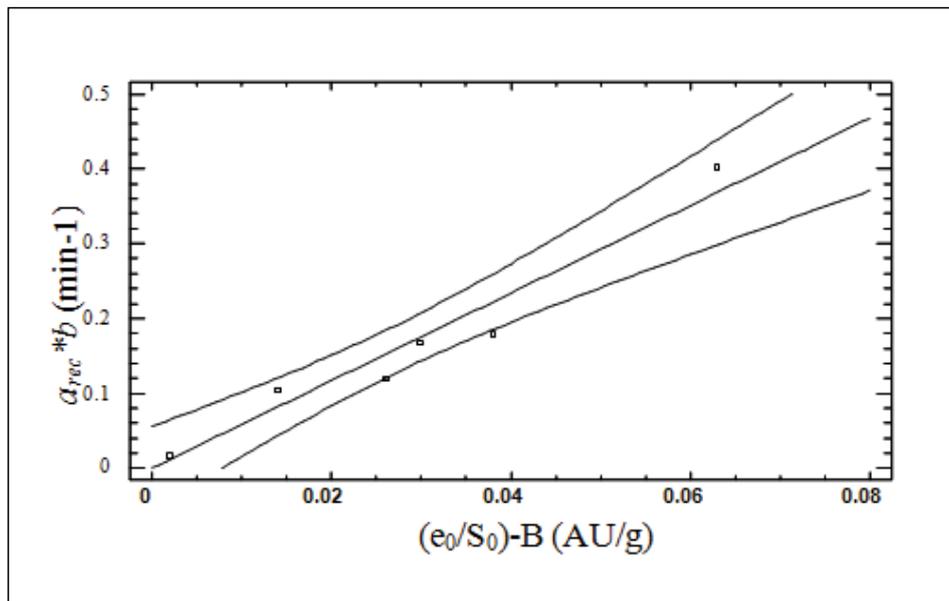
Con base en esto, el modelo cinético quedaría como se presenta en la ecuación 18.

$$r = s_0 \frac{d(GH)}{dt} = 22,940(e_0 - 0,035S_0) \exp\left[\frac{5,848}{22,940}(GH)\right] \quad (18)$$

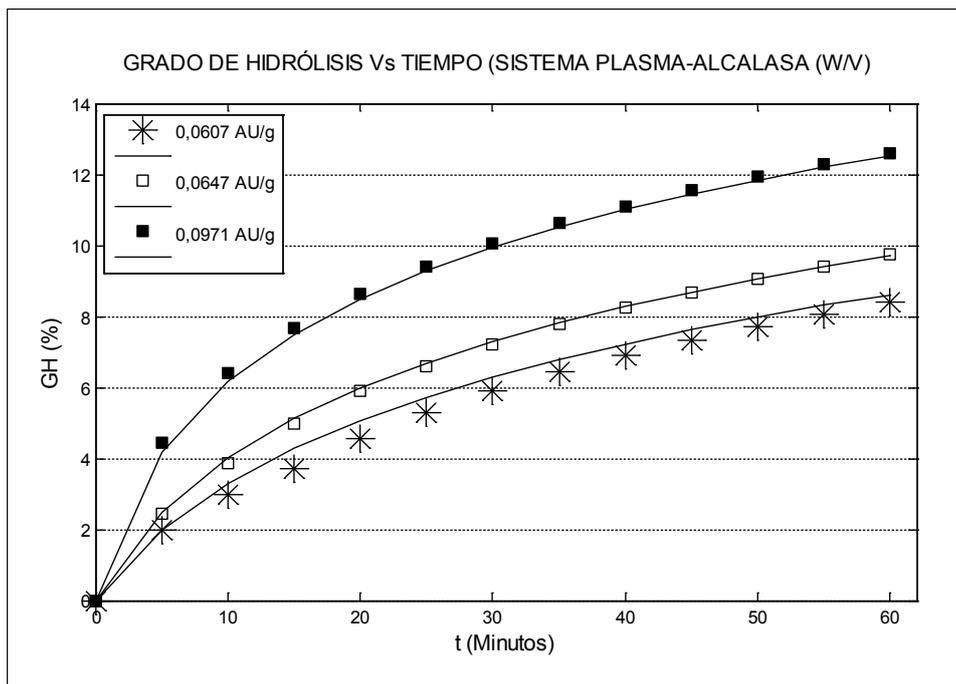
En la figura 8 se muestran los valores predichos por el modelo propuesto en la ecuación 18 (línea continua en cada curva), así como los valores experimentales (curvas con marcadores) para diferentes relaciones de  $e_0/S_0$ . El modelo muestra un error relativo promedio con respecto a los datos experimentales del 7,30 %, lo cual indica un buen ajuste del modelo propuesto, teniendo en cuenta que es una reacción multisustrato.



**Figura 6.** Variación de los diferentes valores de  $a_{rec}$  con  $e_0/S_0$  (AU/g). Límite de confianza del 95 % y  $R^2= 0,965$



**Figura 7.** Variación de los diferentes valores de  $a_{rec} * b$  con  $(e_0/S_0)-B$  (AU/g). Límite de confianza del 95 % y  $R^2 = 0,938$



**Figura 8.** Comportamiento del GH en función del tiempo a diferentes  $e_0/S_0$  (La línea continua representa los valores predichos por el modelo y los marcadores representan los datos experimentales),  $pH=8,0$ ,  $T=55\text{ }^\circ\text{C}$



La ecuación 2 ha sido empleada para estudiar la relación entre el grado de hidrólisis y el tiempo de reacción de diversas fuentes proteicas como garbanzo (Márquez y Fernández, 1993), sistema alcalasa-caseína (Camacho *et al.*, 1993) e hidrólisis trípica de caseína (He, Qi y He, 2002), albúminas de suero lácteo (González-Tello *et al.*, 1994), seroalbúmina bovina (Qi y He, 2006) y hemoglobina bovina (Márquez y Vázquez, 1999). Ello demuestra el amplio espectro de aplicación de este modelo, tanto desde el punto de vista del sustrato, como de complejos enzimáticos y condiciones de operación (Márquez y Vázquez, 1999). Un enfoque más reciente es la aplicación de redes neuronales artificiales para la estimación de los parámetros de la ecuación 2 (Abakarov *et al.*, 2010).

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la relación  $e_0/S_0$  sobre la cinética de hidrólisis enzimática de plasma de bovino y la presentan como una variable clave para optimizar las condiciones de operación tendientes a orientar los valores de  $GH$  hacia regiones de interés. Tal información es importante cuando se quiere dirigir la hidrólisis a la consecución de péptidos en determinados rangos de tamaño, a la optimización de condiciones de operación en escala industrial y al diseño de biorreactores.

#### 4. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluó y validó un modelo matemático que puede usarse para simular la reacción de hidrólisis enzimática de plasma bovino con alcalasa 2,4 L en un reactor batch. El modelo sugiere un mecanismo de reacción que representa una cinética de orden cero con respecto al sustrato, simultánea con una desactivación enzimática de segundo orden e inhibición irreversible de una parte de la enzima presente en la reacción.

Un análisis de la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas a la luz de la ecuación 2 puede llevarse a cabo para distintos tipos de sistemas proteicos (bien de origen animal o vegetal). La deducción del mecanismo cinético basado en la

determinación de los parámetros  $a$  y  $b$  del modelo general y la relación entre  $S_0$ ,  $e_0$ ,  $GH$  con el tiempo de reacción es información de gran valor en actividades de optimización de parámetros, para una potencial producción industrial de péptidos, así como para el diseño y funcionamiento de biorreactores.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia y al Centro de Investigación para el Desarrollo Tecnológico del Carbón (CIDTEC) de la Universidad Popular del Cesar.

#### REFERENCIAS

- Abakarov, A.; Almonacid, S.; Urtubia, S. and Simpson, R. Artificial neural networks benefit in modelling of protein hydrolysis kinetic. Spain, Valencia: Book of abstract, International Conference on Food Innovation, Universidad Politécnica de Valencia, 2010. 111 p.
- Adler-Nissen, J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier, 1986, pp. 116-124.
- Arantes, G. M. (2008). "Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática". *Química Nova*, vol. 31, No. 2 (dezembro), pp. 377-383.
- Beatty, K.; Bieth, J. and Travis, J. (1980). "Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin". *Journal of Biological Chemistry*, vol. 255, No. 9 (May), pp. 3931-3934.
- Benítez, R.; Ibarz, A. and Pagan, J. (2008). "Protein hydrolysates: Processes and applications". *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, vol. 42, No. 2, pp. 227-236.
- Bernardini, D.; Harnedy, R.; Bolton, P.; Kerry, D.; O'Neill, J.; Mullen, E. and Hayes, A. M. (2010). "Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products". *Food Chemistry*, vol. 124, No. 4 (February), pp. 1296-1307.
- 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*, vol. 72, No. 1-2 (May), pp. 248-254.
- Camacho, F.; Gonzalez, P.; Fernández, V.; Páez, M. y Márquez, M. C. (1993). "Hidrólisis de caseína con

- alcalasa". *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 33, No. 1, pp. 59-70.
- Cheison, S. C.; Wang, Z. and Xu, S. (2006). "Hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. I. Characterisation of permeate flux and product recovery by multivariate data analysis". *Journal of Membrane Science*, vol. 283, No. 1-2 (December), pp. 45-56.
- Daoud, R.; Dubois-Delval, V. and Bors-Dodita, L. (2005). "New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin". *Peptides*, vol. 26, No. 5 (May), pp. 713-719.
- Dàvila, E.; Sagner, E.; Toldrà, M.; Carretero, C. and Parés, D. (2007). "Surface functional properties of blood plasma protein fractions". *European Food Research and Technology*, vol. 226, No. 1-2, pp. 207-214.
- González-Tello, P.; Camacho, F.; Jurado, E.; Páez, M. P. and Guadix, E. (1994). "Enzymatic hydrolysis of whey proteins. I. Kinetic model". *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 44, No. 4 (August), pp. 523-528.
- Guadix, A. Producción en reactores de membranas de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral. Universidad de Granada [en línea] 2002: [Consultado el 1 de junio de 2011] Disponible en: <<http://hera.ugr.es/tesisugr/15797284.pdf>>
- Guadix, A.; Guadix, E. M.; Páez, M.; González, P. and Camacho, F. (2000). "Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins". *Ars Pharmaceutica*, vol. 41, No. 1, pp. 79-89.
- He, Z. M.; Qi, W. and He, M. X. (2002). "A novel exponential kinetic model for casein tryptic hydrolysis to prepare active peptides". *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 10, No. 5 (October), pp. 562-566.
- Hyun, C. K. and Park, K. J. (2002). "Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 30, No. 5 (May), pp. 633-638.
- Liu, Q.; Kong, B.; Xiong, Y. and Xia, X. (2010). "Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis". *Food Chemistry*, vol. 118, No. 2 (January), pp. 403-410.
- Márquez, M. C. and Fernández, V. (1993). "Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: Mechanism and kinetics". *Process Biochemistry*, vol. 28, No. 7, pp. 481-490.
- Márquez, M. C. and Vázquez, M. A. (1999). "Modeling of enzymatic protein hydrolysis". *Process Biochemistry*, vol. 35, No. 1-2 (October), pp. 111-117.
- Martínez, O. y Martínez, E. (2006). "Proteínas y péptidos en nutrición enteral". *Nutrición Hospitalaria*, vol. 21, No. 2, pp. 1-14.
- Möller, N. P.; Scholz-Ahrens, K. E.; Roos, N. and Schrezenmeier, J. (2008). "Bioactive peptides and proteins from foods: Indication for health effects". *European Journal of Nutrition*, vol. 47, No. 4 (May), pp. 171-182.
- Nedjar, N.; Dubois, V.; Miloudi, K. and Daoud, R. (2006). "Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin". *Peptides*, vol. 27, No. 9 (September), pp. 2082-2089.
- Prieto, C. A.; Guadix, E. M. and Guadix, A. (2008). "Influence of temperature on protein hydrolysis in a cyclic batch enzyme membrane reactor". *Biochemical Engineering Journal*, vol. 42, No.3 (December), pp. 217-223.
- Qi, W. and He, Z. (2006). "Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model". *Frontiers of Chemistry in China*, vol. 1, No. 3, pp. 308-314.
- Ramos, G.; Fernández, S.; Carrillo, L.; Martínez, E. and Vázquez, L. (2006). "Functional properties of protein fractions isolated from porcine blood". *Journal of Food Science*, vol. 68, No. 4 (May), pp. 1196-1200.
- Rodas, A.; Leal, M.; Arias, B.; Huerta, N. y Márquez, E. (1998). "Adición de plasma y paquete globular en la formulación de jamones cocidos". *Revista Científica (FCV-LUZ)*, vol. 8, No. 1, pp. 35-39.
- Shi, D.; He, Z. and Qi, W. (2005). "Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin". *Process Biochemistry*, vol. 40, No. 5 (April), pp. 1943-1949.
- Takami, H.; Akiba, T. and Horikoshi, K. (1989) "Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 30, No. 2, pp.120-124.
- Trusek-Holownia, A. (2008). "Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor". *Biochemical Engineering Journal*, vol. 39, No. 2 (April), pp. 221-229.
- Tzafirri, Abraham Rami and Edelman, Elazer R. (2007). "Quasi-steady-state kinetics at enzyme and substrate concentrations in excess of the Michaelis-Menten constant. *Journal of Theoretical Biology*, vol. 245, No. 4 (April), pp. 737-748.
- Weber, B. A. and Nielsen, S. S. (1991). "Isolation and partial characterization of a native serine-type protease inhibitor from bovine milk". *Journal of Dairy Science*, vol. 74, No. 3 (March), pp. 764-771.