

Hidrólisis de caseína con alcalasa

Hydrolysis of casein by alcalase

F. Camacho Rubio, P. González Tello, M. Páez Dueñas, M. C. Márquez Moreno
y V. Fernández Cuadrado

Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada. 18071 Granada

Original recibido 16-03-1992. Versión revisada 14-09-1992

RESUMEN

Se ha estudiado la hidrólisis enzimática de caseína bovina con una proteasa comercial, Alcalasa 0,6 L, a pH = 8,0 y 50°C. El tratamiento cinético de los datos experimentales condujo a una ecuación integrada de velocidad que permitió evaluar el grado de hidrólisis en función de las condiciones de operación: concentración inicial de enzima y sustrato, y tiempo de hidrólisis, con una desviación inferior al 5%. La ecuación de velocidad obtenida fue consistente con que la reacción de hidrólisis fuera de orden cero con respecto al sustrato y que simultáneamente se produjera una desnaturalización de la enzima de segundo orden.

ABSTRACT

We have assayed the enzymatic hydrolysis of bovine casein using a commercial protease, Alcalase 0.6 L, at pH = 8.0 and 50°C. Kinetic treatment of the experimental data produced an integral equation for the reaction rate, allowing us to evaluate the degree of hydrolysis as a function of the operating conditions: the initial concentrations of the enzyme and the substrate, and hydrolysis time, with a deviation of less than 5%. The equation for the reaction rate supported the idea that the hydrolysis reaction was one of zero order with respect to the substrate and that a second order denaturalization of the enzyme took place simultaneously.

INTRODUCCION

La hidrólisis enzimática de biopolímeros tiene una gran importancia en la industria alimentaria, ya que mediante estos procesos se pueden mejorar las características físicas, químicas y organolépticas del alimento original, sin detrimento de su valor nutritivo y se facilita su absorción intestinal.

En particular, los hidrolizados de proteínas se utilizan como aditivos de alimentos preparados y en la elaboración de dietas especiales para lactantes y adultos enfermos. Para la primera aplicación se usan generalmente hidrolizados ácidos de soja; para la segunda, deben usarse hidrolizados enzimáticos generalmente de proteínas lácteas: caseína o lactoalbúmina. Los hidrolizados enzimáticos de proteínas para la preparación de dietas especiales deben ser osmóticamente equilibrados, hipoalergénicos y de escaso sabor amargo. De acuerdo con los conocimientos actuales, estos requerimientos implican que es deseable que estén formados por oligopéptidos de 2 a 6 aminoácidos y por consiguiente es necesario alcanzar grados de hidrólisis elevados, alrededor del 20% o superior, con una distribución de tamaños moleculares lo más estrecha posible. Dado el pequeño tamaño de los péptidos en el hidrolizado final, no parece que pueda haber inconvenientes en el uso de proteasas de origen microbiano para estos procesos, siempre que estén autorizadas para su empleo en la industria alimentaria y se separen posteriormente.

Desde el punto de vista cinético, la hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso complejo debido a la existencia de diferentes enlaces peptídicos y a la distinta accesibilidad de los mismos al ataque enzimático, que depende de manera importante del proceso de preparación del concentrado de proteínas utilizado como sustrato. Estas circunstancias dificultan la interpretación de los resultados mediante ecuaciones de cinética enzimática simple y hacen perder significación a los parámetros cinéticos determinados (Azukawa *et al.*, 1985; Postolache y Oncescu, 1989). No obstante, la mayor parte de los trabajos de investigación publicados sobre el estudio cinético de estos procesos indican la existencia de una inhibición del producto o sustrato y la desnaturalización simultánea de la enzima (Constantinides y Aduamankwa, 1980; Markovic *et al.*, 1988).

Por su interés económico, la mayor parte de los trabajos en este campo son objeto de patentes y se preocupan más del grado de hidrólisis alcanzado y de las características de los hidrolizados obtenidos que del estudio cinético del proceso (Parker y Pawlett, 1987; Samuelson y Poulsen, 1987; Frigh *et al.*, 1989).

En este trabajo se da cuenta de los resultados obtenidos en el estudio

cinético de la hidrólisis de caseína con una proteasa comercial de grado alimentario, con vistas al desarrollo de un proceso para la fabricación de hidrolizados de proteínas útiles para la preparación de dietas especiales.

MATERIAL Y METODOS

Como sustrato se ha utilizado una caseína bovina, suministrada por UNIASA (Granada) obtenida por precipitación ácida de leche desnatada. Se determinó su contenido total de nitrógeno por el método de Kjeldhal (85% en peso de proteína) y su humedad por deshidratación en estufa de vacío durante 24 horas (6,4% en peso).

La enzima empleada es una mezcla comercial de Novo Industrias (Madrid), Alcalasa 0.6 L, que se prepara por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformis*. Su principal componente enzimático es subtilisina de Carlsberg, que es una endoproteinasa de tipo serínico. El intervalo óptimo de temperaturas es de 50-70°C y actúa a pH comprendido entre 6 y 10. Se suministra como un líquido de color oscuro y densidad 1,26 g/ml.

La actividad enzimática se ha medido utilizando el método modificado de Anson (1978): se hidroliza hemoglobina desnaturalizada con una cierta cantidad de la proteasa problema a 25°C y pH = 7,5 durante 10 minutos; la hemoglobina no hidrolizada se precipita con ácido tricloroacético y a la disolución resultante después de filtrar se le añade reactivo fenólico (Folin-Ciocalten Phenol Reagent, Merck) que produce un color azul con tirosina y triptófano, midiéndose la absorbancia a 750 nm. Una unidad Anson, UA, es la cantidad de enzima que en las condiciones de reacción normalizadas hidroliza a la hemoglobina con una velocidad tal que se liberan por minuto una cantidad de productos solubles en ácido tricloroacético que dan el mismo color con reactivo fenólico que un miliequivalente de tirosina.

La actividad de la Alcalasa 0.6 L resultó ser de 1,01 UA/g. Conservada a 4°C su actividad permanece prácticamente constante, al menos durante dos meses; en disolución acuosa en el intervalo de concentraciones utilizado en este trabajo, de 0,15 a 1,5 UA/l, y en las condiciones de operación seleccionadas, 50°C y pH = 8,0, pero en ausencia de sustrato, su actividad permanece constante, al menos hasta las tres horas de incubación, que ha sido la duración de la mayor parte de los experimentos realizados.

El dispositivo utilizado en los experimentos cinéticos es un reactor discontinuo de 250 ml de capacidad, bien agitado y con control de temperatura

y pH. La cinética del proceso se sigue por el consumo de base, NaOH 2N, en función del tiempo, ya que la base necesaria para mantener constante el pH corresponde a la neutralización de los grupos ácidos liberados durante la hidrólisis de los enlaces peptídicos.

La conversión o grado de hidrólisis en $^{\circ}/1$, se define mediante

$$x = \frac{\text{Número de enlaces peptídicos hidrolizados}}{\text{Número total de enlaces peptídicos}} \quad (\text{Ec. 1})$$

la relación entre x y el consumo de base viene dada

$$x = \frac{B}{M_p \cdot \alpha \cdot h_t} \quad (\text{Ec. 2})$$

siendo B los equivalentes de base consumidos; α el grado de disociación medio, función de la temperatura y del pH; h_t el número total de equivalentes de enlaces peptídicos por kg de proteína y M_p la masa de proteína en kg. Los valores de α y h_t se tomaron de las tablas publicadas por Novo Industrias (1980), siendo $\alpha = 0,885$ para las condiciones utilizadas en este trabajo y $h_t = 8,2$ para la caseína. El valor de α indicado se ha obtenido a partir de la hidrólisis de proteínas de soja con alcalasa y se puede aplicar con carácter general para conversiones de hasta el 20%; para valores superiores, α disminuye, ya que viene dada por:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad (\text{Ec. 3})$$

y el pK del hidrolizado aumenta al disminuir el tamaño de los péptidos.

Las conversiones calculadas por el consumo de base se han comprobado mediante la determinación de la concentración de grupos α -amino libres, por el método del TNBS (Snyder y Sobocinsky, 1975) utilizando como patrones glicina, alanina, alanil-alanina y alanil-alanil-alanina. Para ello se extraían muestras del reactor que se sumergían en agua hirviendo durante cinco minutos para desnaturalizar la enzima y frenar la hidrólisis. Los valores de x, determinados por ambos procedimientos para los mayores grados de hidrólisis alcanzados, que es cuando su diferencia es mayor, resultaron aceptablemente coincidentes, y parecía ser más conveniente utilizar oligopéptidos como patrones en el método del TNBS.

Todos los experimentos se realizaron a 50°C y $\text{pH} = 8,0$, condiciones

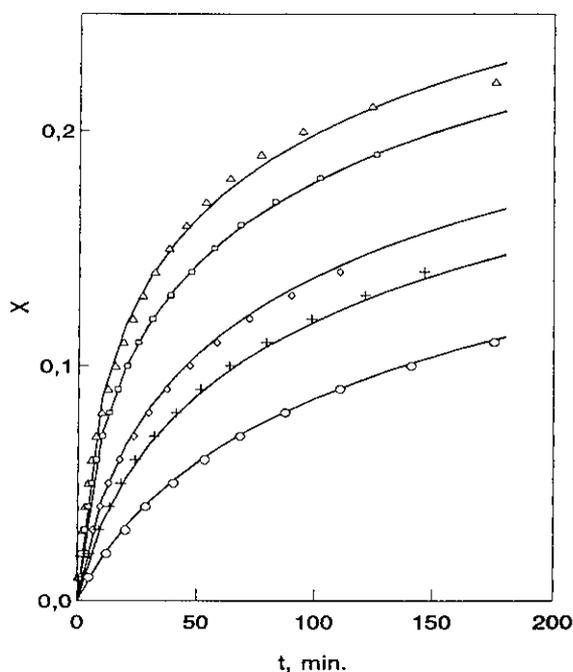


Figura 1. - Influencia de la concentración inicial de enzima. $S_0 = 40,0$ g/l. Valores de E_0 , UA/l: (O) 0,15; (+) 0,31; (◇) 0,46; (□) 1,03; (Δ) 1,53.

Figure 1. - Effect of initial concentration of enzyme. $S_0 = 40.0$ g/l. E_0 values, UA/l: (O) 0.15; (+) 0.31; (◇) 0.46; (□) 1.03; (Δ) 1.53.

óptimas de estabilidad-actividad para el complejo enzimático utilizado. La concentración inicial de enzima se varió en el intervalo de 0,15 a 1,5 UA/l y la concentración de sustrato, expresada en gramos de proteína por litro, en el intervalo de 40 a 85,6.

RESULTADOS Y DISCUSION

En todos los experimentos se observa que la velocidad de hidrólisis disminuye apreciablemente con el tiempo y parece que la conversión tiende a un valor límite, función de las concentraciones iniciales de enzima y de sustrato (Figuras 1 y 2).

Con objeto de aplicar el método diferencial se ajustaron los datos cinéticos, $x-t$, mediante funciones *spline* cúbicas (Klaus y Van Ness, 1967), seleccionando los nodos de manera que correspondan a intervalos iguales de la variable dependiente, x , y el número de éstos, de forma que sea mínimo el sumatorio de los cuadrados residuales, definido por

$$SSR = \frac{\sum (x_{calc} - x_{exp})^2}{M - N} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde M es el número de parejas de datos y N el número de nodos (Tao y Watson, 1988). Mediante estos ajustes se evaluó la velocidad de reacción a diferentes grados de hidrólisis, siempre dentro del intervalo experimental.

Puesto que para unas concentraciones iniciales de enzima y sustrato dadas, la composición de la fase líquida en cada instante dependerá exclusivamente de la conversión, deberá cumplirse que:

$$\frac{dx}{dt} = f(x) \quad (\text{Ec. 5})$$

De las diferentes relaciones funcionales ensayadas para esta expresión, la que mejor ajusta nuestros resultados experimentales (Figuras 3 y 4) es:

$$\frac{dx}{dt} = a \cdot \exp(-bx) \quad (\text{Ec. 6})$$

Integrando la Ecuación 6 se obtiene

$$x = \frac{1}{b} \ln(1 + a \cdot b \cdot t) \quad (\text{Ec. 7})$$

que permite determinar los mejores valores de a y b por regresión no lineal, eliminando así los errores inherentes al cálculo de las derivadas en el método diferencial. Los valores obtenidos de estos parámetros en función de las concentraciones iniciales de enzima y sustrato se indican en la Tabla 1. Se observa en esta tabla y en las Figuras 3 y 4 que el valor de b no muestra ninguna tendencia al variar las concentraciones iniciales de enzima y sustrato, y parece ser constante, es decir, independiente de ambas variables. Su valor medio resulta ser: 19 ± 1 , y con éste se han recalculado los valores medios de a para todos los experimentos que se indican también en la Tabla 1. Los valores de a han resultado proporcionales a la relación enzima/sustrato, obteniéndose la ecuación:

$$a = (0,58 \pm 0,02) \frac{E_o}{S_o} \quad (\text{Ec. 8})$$

sustituyendo los valores de a y b obtenidos en la Ecuación 7

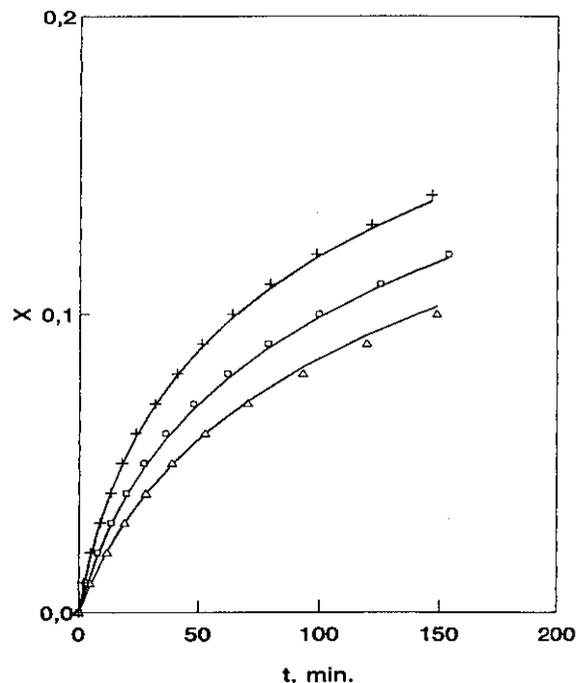


Figura 2.-Influencia de la concentración inicial de sustrato. $E_o = 0,31$ UA/l. Valores de S_o , g/l: (+) 40,0; (□) 62,2; (Δ) 85,6.

Figure 2.-Effect of initial concentration of substrate. $E_o = 0.31$ UA/l. S_o values, g/l: (+) 40.0; (□) 62.2; (Δ) 85.6.

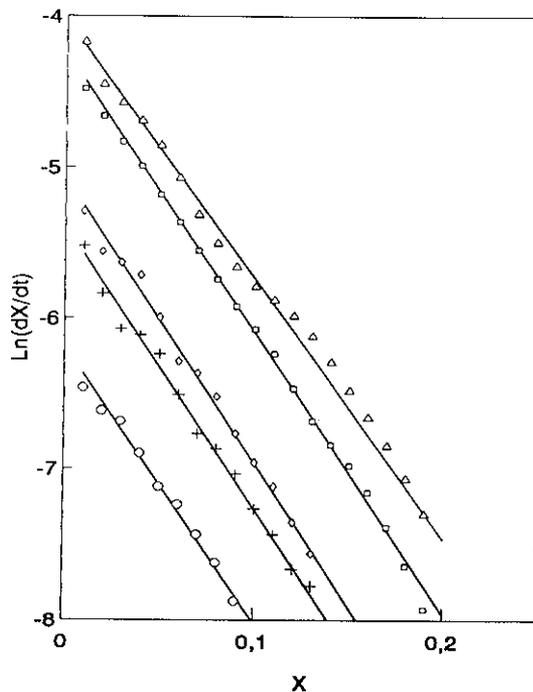


Figura 3.- Análisis diferencial de los datos cinéticos.
 $S_0 = 40,0$ g/l. Valores de E_0 , UA/l: (O) 0,15; (+) 0,31; (\diamond) 0,46; (\square) 1,03; (Δ) 1,53.

Figure 3.- Differential analysis of kinetics data.
 $S_0 = 40,0$ g/l. E_0 values, UA/l: (O) 0.15; (+) 0.31; (\diamond) 0.46; (\square) 1.03; (Δ) 1.53.

$$x = 0,053 \ln\left(1 + 11 \frac{E_0 \cdot t}{S_0}\right) \quad (\text{Ec. 9})$$

ecuación que se ha utilizado para trazar las líneas continuas en las Figuras 1 y 2, y que reproduce los resultados experimentales con una desviación inferior a $\pm 5\%$.

La Ecuación 9 indica que la combinación de la variable de operación $E_0 \cdot t / S_0$ (Ec. 10), puede utilizarse como variable intensiva del tratamiento enzimático, ya que el grado de hidrólisis obtenido depende exclusivamente de ella.

Teniendo en cuenta las Ecuaciones 6 y 8, la velocidad de hidrólisis viene dada por:

$$r_h = S_0 \cdot \frac{dx}{dt} = a' \cdot E_0 \cdot \exp(-bx) \quad (\text{Ec. 11})$$

que puede explicarse si la enzima tiene una elevada afinidad por el

sustrato, de manera que un balance de enzima conduce a

$$(ES) = \frac{K_e \cdot S_0 \cdot e}{1 + K_e \cdot S_0} \approx e \quad (\text{Ec. 12})$$

$$(E) = \frac{e}{1 + K_e \cdot S_0} \approx \frac{e}{K_e \cdot S_0} \quad (\text{Ec. 13})$$

siendo e la concentración total de enzima activa en cualquier instante, y se ha utilizado S_0 en vez de s , concentración de sustrato en cualquier instante, admitiendo que la enzima tiene afinidad tanto por los enlaces peptídicos como por los extremos carboxílicos libres, inhibición competitiva de producto, o que en la hidrólisis la disminución de enlaces peptídicos se compensa con el aumento de la accesibilidad de los mismos al ataque enzimático al liberarse

péptidos de menor tamaño.

En estas condiciones la velocidad de hidrólisis vendría dada por

$$S_o \cdot \frac{dx}{dt} = k_b \cdot e \quad (\text{Ec. 14})$$

y si simultáneamente se produce una desnaturalización de la enzima de segundo orden, por ataque de la enzima libre a la enzima ligada al sustrato:

$$-\frac{de}{dt} = K_d \cdot \frac{e}{K_s \cdot S_o} \cdot e = k'_d \cdot \frac{e^2}{S_o} \quad (\text{Ec. 15})$$

Combinando las Ecuaciones 14 y 15

$$-\frac{de}{dx} = \frac{k'_d}{k_b} \cdot e \quad (\text{Ec. 16})$$

que, por integración

$$e = E_o \cdot \exp\left(-\frac{k'_d}{k_b} \cdot x\right) \quad (\text{Ec. 17})$$

y sustituyendo en Ecuación 14

$$S_o \cdot \frac{dx}{dt} = k_b \cdot E_o \cdot \exp\left(-\frac{k'_d}{k_b} \cdot x\right) \quad (\text{Ec. 18})$$

que coincide con la Ecuación 11 obtenida en la interpretación cinética.

El mecanismo simplificado propuesto explicaría que, aunque no se produce una disminución apreciable de la actividad enzimática en ausencia de sustrato y en las condiciones de operación durante el tiempo utilizado en los experimentos, ésta tenga lugar en presencia del sustrato. Por otra parte, la

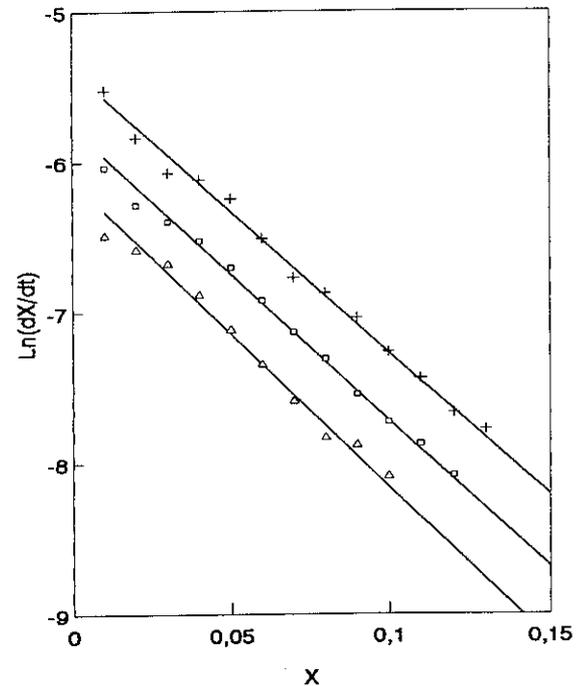


Figura 4.- Análisis diferencial de los datos cinéticos. $E_o = 0,31$ UA/l. Valores de S_o , g/l: (+) 40,0; (□) 62,2; (Δ) 85,6.

Figure 4.- Differential analysis of kinetics data. $E_o = 0.31$ UA/l. S_o values, g/l: (+) 40.0; (□) 62.2; (Δ) 85.6.

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la Ecuación 7.

Table 1. Kinetics parameters of Equation 7

Exp	E_0/S_0 , UA/g	a , min^{-1}	b	a_m , min^{-1}
1A	0,00375	0,00222	19,3	0,00212
1B	0,00375	0,00191	17,4	
2A	0,00775	0,00445	18,9	0,00465
2B	0,00775	0,00473	18,8	
3A	0,01150	0,00620	19,1	0,00626
3B	0,01150	0,00641	18,9	
4A	0,02580	0,01440	18,6	0,01480
5A	0,03830	0,01810	17,2	0,02300
5B	0,03830	0,01760	17,2	
6A	0,00498	0,00298	19,4	0,00302
6B	0,00498	0,00325	19,5	
7A	0,00362	0,00213	20,1	0,00204
7B	0,00362	0,00225	20,6	

desnaturalización de la enzima sólo podría ser de segundo orden, ya que, para una concentración inicial de sustrato dada, el grado de hidrólisis alcanzado depende sólo del producto $E_0 \cdot t$, lo que indica que no se produce desnaturalización enzimática o que ésta es de segundo orden con respecto a la enzima (Camacho Rubio *et al.*, 1988).

La desnaturalización de la enzima puede explicar también la forma de las curvas de la Figura 1, en las que el grado de hidrólisis tiende a un valor límite que depende de E_0 y que es pequeño con respecto a la hidrólisis total.

La influencia negativa de la concentración inicial de sustrato que indica la Figura 2 está de acuerdo con que la reacción de hidrólisis sea de orden cero con respecto al sustrato (Ecuación 14).

La ecuación integrada de velocidad obtenida (Ecuación 9) expresa la relación entre las condiciones de operación y el grado de hidrólisis alcanzado y puede utilizarse para optimizar las concentraciones iniciales de sustrato y de enzima y el tiempo de hidrólisis en función de los costes de operación y amortización y de las características requeridas en el hidrolizado que determinan las operaciones posteriores a la hidrólisis: ultrafiltración, mezcla con otros componentes de la dieta y secado por pulverización.

SYNOPSIS

The preparation of special foods for babies and sick adults often requires

that lactic proteins be broken down by enzymatic hydrolysis. In these processes high degrees of hydrolysis are required to obtain molecular weights of less than 1000 D, and thus avoid bitter tastes and prevent allergic reactions. Neither is it suitable for the product to contain a high proportion of free aminoacids, which would make them hyperosmotic and liable to cause diarrhoea. These demands suggest that the products should be made up of oligopeptides of between 2 and 6 amino acids with as narrow as possible a range of molecular size. Given the small size of the peptides required, it is convenient to use proteases of microbial origin, provided they are permissible for alimentary use and that they are separated after hydrolysis.

This paper reports here on the results of a kinetic study into the hydrolysis of bovine casein using a commercially available, alimentary grade protease, Alcalase 0.6 L, with a view to developing a process for manufacturing hydrolysates which might be useful in the preparation of special diets.

Enzyme activity was measured by a modified version of Anson's method and the kinetic of the process was followed by measuring base consumption and determining the concentration of free amino groups by the TNBS assay. All the experiments were made at pH = 8.0 and 5°C in a well-stirred batch reactor. The initial enzyme concentration was altered within the range of 0.15 to 1.5 AU/L and the substrate concentration (expressed in grams of protein per litre) between 40.0 and 85.6 (Figures 1 and 2).

In all the experiments it can be seen that the rate of hydrolysis decreased appreciably with time and that the conversion seemed to tend towards a limit, which is a function of the initial concentrations of both enzyme and substrate. By applying the differential method and adjusting the conversion-time experimental results with cubic spline functions we obtained rate Equation 6, Figures 3 and 4. On integrating this equation the values for its kinetic parameters, a and b, could be determined by non-linear regression (Table 2).

The results indicate that b does not depend on the initial concentration of either enzyme or substrate and that its value for the reaction in question is 18.9. Parameter a, on the other hand, is related to the initial enzyme and substrate concentrations in the manner shown in Equation 8.

The integral rate equation

$$x = 0.0529 \ln\left(1 + 10.9 \frac{E_0 \cdot t}{S_0}\right)$$

shows that the intensive variable of the enzymatic treatment is $E_0 \cdot t / S_0$ and reproduces the experimental results with a maximum deviation of 5%.

The form of the kinetic equation that leads to an interpretation of the experimental results.

$$r_h = S_o \cdot \frac{dx}{dt} = a' \cdot E_o \cdot \exp(-bx)$$

is explicable if the enzyme has a high affinity for the substrate to the extent that practically all of it is bound to the substrate and the rate of hydrolysis turns out to be of zero order with respect to the substrate.

$$S_o \cdot \frac{dx}{dt} = k_h \cdot e$$

and if, at the same time, a second order denaturalization of the enzyme occurs via autolysis brought about by the free enzyme, the concentration of which is proportional to E_o/S_o , to the enzyme bound to the substrate

$$-\frac{de}{dt} = k'_d \cdot \frac{e^2}{S_o}$$

By combining these two equations to eliminate the time variable and integrating, the following equation for the concentration of active enzyme as a function of the conversion is obtained

$$e = E_o \cdot \exp\left(-\frac{k'_d}{k_h} \cdot x\right)$$

which, substituted into the hydrolysis rate equation, leads to the expression obtained from the experimental results.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación está financiada por UNIASA (Unión Industrial y Agro-ganadera, S.A.), a cuyo Departamento de I+D agradecemos su colaboración.

BIBLIOGRAFIA

- ANSON, A. (1978). *Modified Anson-hemoglobin method for the determination of proteolytic activity*. Madrid: Novo Industrias.
- AZUKAWA, R., ITO, O. y YOKOYAWA, K. (1985). Degradation of casein by crystalline low-temperature-active proteinase from *Streptococcus lactis*. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 56, 56-61.
- CAMACHO RUBIO, F., BRAVO RODRÍGUEZ, V. y PÁEZ DUEÑAS, M. P. (1988). Influencia de la desnaturalización de la enzima en la cinética enzimática. *Afinidad* 45, 506-508.
- CONSTANTINIDES, A. y ADU-AMANKWA, B. (1980). Enzymatic modification of vegetable protein: mechanism, kinetics and production of soluble and partially soluble protein in a batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 1 543-1 564.
- FAIGH, J. G., STUART, M. J. y TALBOTT, L. L. (1989). *Enzymatic hydrolysis of proteins*. Eur. Pat. 0325986 A2.
- KLAUS, R. S. y VAN NESS, H. C. (1967). An extension of the spline fit technique and application to thermodynamic data. *AIChE J.* 13, 1 132-1 136.
- MARKOVIC, I., TOPOLEVEC, V., MARIC, V. y JOHANIDES, V. (1988). The barley protein degradation: mechanism of protein solubilization during barley mashing with neutral proteinase. *Biotechnol. Bioeng.* 32, 18-27.
- NOVO INDUSTRIAS (1980). *Use of food grade alcalase or neutrase for controlled enzymatic hydrolysis of proteins*. Madrid: Novo Industrias.
- PARKER, D. M. y PAWLETT, D. (1987). *Flavour control of protein hydrolysates*. Eur. Pat. 0223560 A2.
- POSTOLACHE, C. y ONCESCU, T. (1989). Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalized by alcalase. *Rev. Roum. Chim.* 34, 581-584.
- SAMUELSON, E. G. y POULSEN, O. M. (1987). *A peptide preparation, a process for producing it and use of the peptide preparation*. Eur. Pat. 0226221 A1.
- SNYDER, S. L. y SOBOCINSKY, P. Z. (1975). An improved 2,4,6 trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal. Biochem.* 64, 284-288.
- TAO, T. M. y WATSON, A. T. (1988). An adaptative algorithm for fitting with splines. *AIChE J.* 34, 1 722-1 725.