

Hidrolizados proteicos y perspectivas del modelamiento en cinética enzimática de proteínas: **una revisión**

*Hydrolyzed protein and prospects of modeling
in protein enzyme kinetics: Review*

Omar Alfredo Figueroa Moreno

Ingeniero agroindustrial. Docente de la Fundación Universitaria del Área Andina, Sede Valledupar.
omfimo22@gmail.com

José Edgar Zapata Montoya

Ingeniero químico, Magister y Doctor. Grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos,
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentos, Universidad de Antioquia, Colombia.

Lina Margarita Buelvas

Ingeniera agroindustrial. Docente de la Fundación Universitaria del Área Andina, Sede Valledupar.

Orieta Ortiz

Ingeniera química. Docente la Fundación Universitaria del Área Andina, Sede Valledupar.

RESUMEN

Los hidrolizados enzimáticos de proteínas están siendo ampliamente estudiados por sus variadas aplicaciones, que van desde bondades nutricionales y mejoras en las propiedades funcionales, hasta su potencial uso como alimentos nutraceuticos, por sus efectos biológicos específicos. Debido a esto se ha generado en las últimas décadas un interés por el modelamiento de la cinética en la hidrólisis enzimática y la determinación de los parámetros correspondientes, bien a la luz del análisis de los mecanismos enzimáticos supuestos, de los modelos empíricos y aspectos más complejos como el análisis del contexto sistémico de la enzima.

Palabras clave: modelos enzimáticos, hidrólisis proteica, cinética enzimática, hidrolizados proteicos.

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysates of proteins are being widely studied for their various applications, ranging from nutritional benefits and improvements in functional properties to their potential use as a nutraceutical food for their biological effects. This generates interest in modeling the kinetics of hydrolysis and determination of kinetic parameters, but in the light of the experimental analysis of assumed enzymatic mechanisms, empirical models and more complex aspects such as analysis of the systemic context of the enzyme.

Key Words: Enzyme models, protein hydrolysis, enzyme kinetic, protein hydrolysates.

Introducción



Se ha estudiado que los hidrolizados de proteínas potencian diversas características funcionales, como por ejemplo

baja viscosidad, mayor capacidad de agitación, dispersión y alta solubilidad, las cuales les conceden ventajas para el uso en muchos productos alimenticios, respecto a las proteínas originales (Kim *et al.*, 2007; Kong *et al.*, 2007; Lamsal *et al.*, 2007; Paraman *et al.*, 2007; Ruiz-Henestrosa *et al.*, 2007; Wasswa *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2008). Lo que los hace ser considerados para su utilización en muchos procesos alimentarios.

Desde el punto de vista de la nutrición, las proteínas y péptidos procedentes de alimentos están siendo empleados con el fin de mejorar algunas funciones biológicas o de tratar de prevenir o reducir el riesgo de enfermedad, pues se ha establecido que algunos péptidos obtenidos por hidrólisis de proteínas son capaces de ejercer efectos biológicos específicos, tales como antimicrobianos, antivirales, anticancerígeno, opioide, antioxidante, antihipertensivo, antitrombótica, citomoduladora. (Gomes, I. *et al.*, 2010; Guerard, F. *et al.*, 2010; Liu, Q. *et al.* 2010; Moller, N. P. *et al.*, 2008; Paul, M., Somkuti, G. A., 2010). Además de sus beneficios en la fabricación de dietas enterales, para personas con desordenes estomacales y problemas de mucosa intestinal (Benítez, R. *et al.*, 2008).

Los péptidos bioactivos son péptidos cortos de aproximadamente 2-30 ami-

noácidos de longitud. Ellos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína matriz y pueden ser liberados durante la digestión gastrointestinal, durante la elaboración de alimentos o por hidrólisis con enzimas comerciales (Bernardini, R. D. *et al.*, 2011).

Estos péptidos con actividad biológica han sido aislados a partir de proteínas de variadas procedencia, como leche, sardina, maíz, soja, huevo, gelatina, huesos de cerdo, arroz, pescado, garbanzo, etc. (Benítez, R., 2007; Chen *et al.*, 2007; Girón-Calle, J. *et al.*, 2010; Guerard, F. *et al.*, 2010; Kannana *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2008; You, S. J. *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2006).

Estudios en hidrólisis de proteínas de plasma bovino han confirmado la existencia de péptidos con actividad inhibidora de la enzimas convertidoras de la angiotensina (ACE) (Hyun, C. K., Park, K. J., 2002; Hyun, C. K., Shin, H. K., 2000). Del mismo modo en que péptidos con actividad antioxidante, efectos inmunomoduladores, antitrombóticos y opioides han sido aislados de variadas proteínas nativas (Hartman, R., Meisel, H., 2007; Liu, Q. *et al.*, 2009). Así como péptidos con propiedades antimicrobianas han sido confirmados en hidrolizados de hemoglobina (Daoud, R. *et al.*, 2005; Mak, P. *et al.*, 2004; Nedjar, N. *et al.*, 2006; Nedjar, N. *et al.*, 2008).

Debido a este uso potencial, existe hoy en día gran interés por predecir los comportamientos de sistemas que contemplan reacciones de hidrólisis enzimática a través de ordenadores, con el fin de dimensionar equipos industriales, pronosticar comportamientos dinámi-

cos, controlar tiempos de proceso y otras variables cinéticas (Figuroa, O. *et al.*, 2012). Es importante resaltar que la optimización de estos procesos depende del comportamiento cinético, que puede llegar a ser muy complejo para sistemas con sustratos, como las proteínas, debido al gran número de enlaces y péptidos (Guadix, A. *et al.*, 2000).

En este artículo se presenta una revisión de los conceptos relacionados con los procesos de hidrólisis enzimática de proteínas, además de una perspectiva sobre modelación en cinética enzimática y su importancia en la comprensión de los sistemas enzimáticos, resaltando las bondades del estudio cinético de las reacciones enzimáticas, tanto desde la perspectiva de la especificación de los mecanismos catalíticos de las enzimas, como una descripción de la cinética enzimática que tiene en cuenta el contexto sistémico en el que se encuentra la enzima.

Hidrólisis enzimática de proteínas

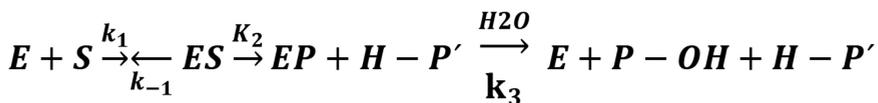
La hidrólisis enzimática de proteínas es una reacción consistente en la ruptura, catalizada por las enzimas, de los enlaces

peptídicos que estructuran las cadenas proteicas, consumiéndose una molécula de agua en el ataque nucleofílico por cada enlace roto, lo cual provoca la liberación de grupos aminos y carboxilos terminales, surgiendo la dependencia del estado de preconización con el pH. (Adler-Nissen, 1986).

Para cuantificar el avance de la reacción, se emplea el criterio del grado de hidrólisis (GH), el cual es una relación entre el número de enlaces peptídicos liberados y el número de enlaces presentes en la proteína nativa. El GH puede ser determinado por los siguientes métodos: 1) estimación del nitrógeno soluble, 2) determinación de los grupos α -amino liberados, 3) valoración del protón liberado en la hidrólisis y 4) el descenso del punto crioscópico (Guadix, 2002).

Fuentes proteicas

Para la elección de una fuente proteínica adecuada debe tenerse en cuenta el uso que vaya a tener el hidrolizado, así como el valor agregado del producto final con respecto al sustrato inicial (Benítez, 2007). Este material de partida puede ser de origen animal, vegetal o bacteriano



(1)

y debe seleccionarse teniendo en cuenta el uso que vaya a tener el hidrolizado. Cuando se trata de favorecer propiedades tecnofuncionales, como la capacidad gelificante o espumante, se emplea colágeno, gelatina, huevos, carnes o vísceras, entre otras; como fuente de nitrógeno, en alimentación animal se emplean proteínas de pescado y microbianas, en alimentación humana, principalmente proteínas lácteas y vegetales (Guadix, 2000).

Estas proteínas son también fuentes de péptidos con actividad biológica y pueden ser empleados en la formulación de alimentos funcionales. En esto se destacan las proteínas lácteas, de vísceras de peces, huesos de cerdo, vegetales, hemoglobina y plasma de bovino, entre las que se ha encontrado actividad antioxidante, capacidad inhibidora de la ACE, opioide, antitrombótica y antimicrobianas (Korhonen y Pihlanto, 2003; Ferreira *et al.*, 2007; Xinyan *et al.*, 2010; Jae-Young *et al.*, 2009; Qian Liu *et al.*, 2010; Benítez, 2007; Reddy, K. V. R, *et al.*, 2004).

Proteasas

Las enzimas proteolíticas o proteasas comerciales hidrolizan los enlaces peptídicos con diferentes grados de intensidad y de selectividad. De esta manera, se usará la enzima más adecuada de acuerdo con la necesidad de la transformación requerida (Badui, 2006).

Con respecto a las enzimas, actualmente se encuentran disponibles comercialmente muchas proteasas de grado

alimenticio (Tabla 1). Estas proteasas pueden ser clasificadas por su origen (animal, vegetal, bacteriano o fúngico), por su modo de acción catalítica (endo- o exo- actividad) o con base en su sitio catalítico (serinproteasas, cisteinproteasas, aspartato proteasas, metaloproteasas, interviniendo los aminoácidos serina, cisteína, ácido aspártico o un catión metálico). Las enzimas tienen una conformación tridimensional específica que cambia en la catálisis generando tensión en la molécula y volviéndola susceptible a reacción, acelerando las velocidades de reacción en el orden de 10²-10¹¹ (Wiley y Sons, 1986).

Cinética enzimática de proteínas

La cinética enzimática se encarga del estudio de la velocidad con que se dan las reacciones catalizadas por enzimas. Los trabajos publicados en esta área son relativamente escasos y algunos admiten cinética simples de un solo sustrato tipo Michaelis-Menten, como se indica en la ecuación (2) (Mukataka *et al.*, 1992). En estos casos, la estimación de los parámetros cinéticos se hace generalmente a través de la linealización de la ecuación (2), bien en la forma de Langmuir, Lineweave-Burk o Eadie-Hofstee.

$$r = \frac{r_{max}S}{k_m + S} \quad (2)$$

Del mismo modo, han sido planteados modelos de Michaelis-Menten con doble sustrato. Barros y Malcata (2004) estudiaron la hidrólisis del lacto suero, con cardosin A, una enzima extraída de la flor del *Cynarra cardunculus*. Un modelo tipo Michaelis-Menten con doble sustrato (4 parámetros de ajuste) fue analizado y se consideró la coexistencia de dos sustratos α -lactoalbúmina y β -lactoglobulinas. La determinación de las constantes cinéticas del sistema pone de manifiesto la mayor afinidad de la enzima por α -La que por β -Lg. En este modelo, los parámetros fueron evaluados por análisis de regresión no lineal a través de los datos experimentales, obtenidos de la desaparición α -La y β -Lg, por FPLC.

Anteriormente, Barros y Malcata (2002) habían planteado un modelo que incluía

doble enzima (cardosin A y B) y doble sustrato (α -La y β -Lg). Estos extractos enzimáticos han sido utilizados por años en la elaboración tradicional de quesos en Portugal y España. Un análisis multirespuesta de regresión no lineal se empleó de igual forma para la evaluación de los ocho parámetros de ajuste y se hallaron resultados similares a los mencionados.

Pese a que según los autores estas aproximaciones eventualmente podrían ser empleadas para simular la hidrólisis del lactosuero con proteasas en general, lo cierto es que, en la mayoría de los casos, modelos como los anteriores resultan insuficientes para explicar cinéticas complejas como la de las proteínas, donde se da la ruptura simultánea de enlaces de distinta reactividad, se generan productos que se convierten a su vez en

Tabla 1. Descripción de algunas proteasas comerciales y su clasificación.

Tipo de proteasa	Nombre	Fuente	Temp °C	Intervalo de pH	Sitio de acción catalítica
Serinproteasa					
Animal	Trypsina	Porcino-bovino	30-60	7--9	*Lys (or Arg) ---
	Quimotripsina		45-55	8--9	*Trp (or Tyr, Phe,Leu)
	Elastasa			6--8	*Ala
Bacterial	Substilisín. Carlsberg, 'Alcalase'	Bacillus licheniformis	50-60	6--10	-*AAhf----
	Subst. BPN, Substilisín Novo	Bacillus amyloliquefaciens	40-55	6--10	

*sitio de acción de la proteasa por el sustrato

AAhf= Aminoácidos hidrofóbicos

sustratos y se manifiestan fenómenos de inhibición y desactivación enzimática (Figueroa *et al.*, 2012).

Esto ha motivado al empleo de modelos que se basan en ecuaciones cinéticas empíricas, que aunque no describen posibles mecanismos de reacción, en algunos casos son útiles para explicar los resultados obtenidos. Margot *et al.* (1997) propusieron modelos empíricos en aras de explicar el comportamiento cinético del sistema lactosuero-tripsina. La reacción fue seguida con la fracción de nitrógeno no proteico (NNP) y bajo condiciones de inactivación moderadas (T menor de 60 °C), el modelo (3) fue probado satisfacto-

riamente; mientras que el (4) explica en gran medida los datos obtenidos, cuando se presentan bajas velocidades de desactivación e inhibición por sustrato y el (5) puede ser empleado cuando se registran fuertes inactivaciones de la enzima

La ecuación (6) representa, por su parte, un balance general en el equilibrio de un reactor discontinuo sujeto a inhibición competitiva y no competitiva por productos, así como inhibición por sustrato. Este modelo se basa en la cinética de Michaelis-Menten extendida, por lo tanto, los parámetros cinéticos pueden ser interpretados.

$$\frac{dNNP}{dt} = \frac{a_1 a_2}{(a_2 + t)^2} + a_3 \tag{3}$$

$$\frac{dNNP}{dt} = a_1 \frac{e_0}{S_0^2} \exp(-a_2 NPN) \tag{4}$$

$$\frac{dNNP}{dt} = a_1 a_2 \exp(-a_2 t) + a_3 a_4 \exp(-a_4 t) \tag{5}$$

$$\frac{S_0}{e_0} \frac{dNNP}{dt} = \frac{a_1 S_0 (a_4 - NNP)}{a_2 + S_0 (a_4 - NNP) + 2 a_3 S_0^2 (NNP - NNP_0) (a_4 - NNP)} \tag{6}$$

Como puede verse, algunos modelos empíricos de naturaleza puramente matemática, así como otros con una sólida formación en los mecanismos de reacción enzimática pueden ser empleados para ajuste de datos de los experimentos de hidrólisis de las proteínas (Margot *et al.*, 1997).

También se han abordado fenómenos de inhibición (competitiva o no competitiva), por sustrato o por productos de hidrólisis, a través de la deducción de ecuaciones de la forma de la ecuación de M-M, basados en el mecanismo de reacción propuesto. Tardioli P *et al.* (2005) ajustaron los resultados experimentales a un modelo de M-M, con inhibición por producto (ecuación 7). El sustrato empleado fue una solución de polipéptidos obtenidos de la hidrólisis secuencial de suero de queso con tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa (50 °C, pH 9.5). La reacción es catalizada por Alcalase® inmovilizada en 10 % de agarosa y seguida por el método del pH-stat. Los parámetros k_m , k_1 , y k_2 (constantes de Michaelis, de inhibición y de velocidad, respectivamente) fueron estimados por el método de Levenberg–Marquardt, los valores de inicialización de estos se determinaron empleando la linealización de Lineweaver–Burk. La variable N, en la ecuación (7), corresponde al número de enlaces peptídicos que pueden ser hidrolizadas por Alcalase®, que es cuantificado en los polipéptidos prehidrolizados de partida. Lo cual es razonable, teniendo en cuenta que seguramente un sustrato

que contiene grupos aminos libres que inhiben la hidrólisis presentará una cinética diferente que un grupo de proteínas, y este efecto debe ser considerado de alguna manera. Sin embargo, Sousa *et al.* (2004) habían probado el modelo con éxito en las mismas condiciones, pero a partir de lactosuero entero.

$$r_N = \frac{Ke_0N}{K_m \left[I \left(\frac{I}{K_I} \right) \right] + N} \quad (7)$$

Es claro que pese a sus limitaciones las aproximaciones de Michaelis-Menten, bien en su forma sencilla o considerando procesos de inhibición, representan un buen punto de partida para el análisis de la cinética enzimática de proteínas. Trusek-Holownia (2008) empleó modelos de M-M, sin inhibición y con inhibición por sustrato, para la obtención de hidrolizados proteicos de caseína en un reactor de membrana.

Además de los efectos de inhibición por sustrato y producto, la contribución de los fenómenos de desactivación enzimáticos pueden ser tenidos en cuenta y deducidos experimentalmente en el análisis de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas, basados en la ecuación de M-M. Así, modelos de la forma general de la ecuación (8) pueden ser empleados, donde a y b pueden tener diferentes expresiones, dependiendo del mecanismo de reacción y definen los parámetros cinéticos del sistema (Tabla 2).

$$\frac{d(DH)}{dt} = a \text{ EXP } [-b(DH)]$$

(8)

Expresiones de este tipo han sido empleadas en reactores Batch para explicar la velocidad de hidrólisis enzimática, con desactivación enzimática y cinética de orden cero, en sustratos como: caseínas (Camacho *et al.*, 1993), lactoalbuminas (Gonzales-Tello *et al.* 1994), hemoglobina bovina (Márquez y Vázquez, 1999), plasma bovino (Figueroa *et al.*, 2012) y sustratos de origen vegetal (Márquez y Fernández, 1993). Mientras que la desactivación enzimática y la inactivación por sustrato fueron corroboradas en un sistema BSA-tripsina (Wei Qi y Zhimin He, 2006). En cada uno de estos casos se establecieron

bases importantes para la optimización de los procesos.

Doping *et al.* (2005) estudiaron el comportamiento cinético de BSA con tripsina, empleando técnicas de agrupamiento. El método combina grupos de componentes que tienen comportamientos cinéticos similares en varios bloques con el fin de reducir el número de variables y parámetros, simplificando de esta forma el complicado sistema. Esta técnica es ampliamente empleada en la industria petroquímica.

Este modelo se basó en la definición de cuatro zonas de pesos moleculares en los hidrolizados obtenidos (Figura 1). El grupo A corresponde a los péptidos de mayor peso molecular y D a los de menor. El modelo establecido fue de M-M con inhibición por sustrato y producto, además de una inactivación de primer orden de la enzima.

Tabla 2. Diferentes expresiones de los parámetros a y b para la ecuación exponencial.

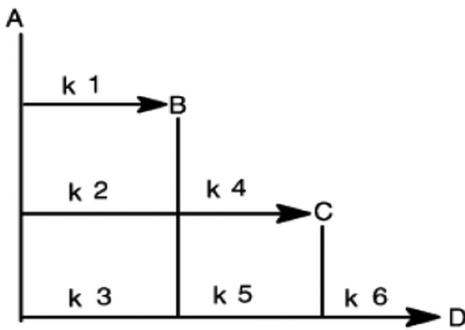
Mechanism	a	a
No inhibition	$\frac{k_2 e_0}{s_0}$	$\frac{k_3 K_m}{k_2}$
Substrate-inhibition	$\frac{k_2 K_s e_0}{s_0 K_s + s_0^2}$	$\frac{k_3 K_m K_s}{k_2 (K_s + s_0)}$
Product-inhibition	$\frac{k_2 e_0 K_p}{s_0 K_p + p K_m}$	$\frac{k_3 K_m K_p s_0}{k_2 (s_0 K_p + p K_m)}$
Substrate and product inhibition	$\frac{k_2 e_0 K_s K_p}{K_s K_p s_0 + K_p s_0^2 + K_m K_s p}$	$\frac{k_3 K_m K_s K_p s_0}{k_2 (K_s K_p s_0 + K_p s_0^2 + K_m K_s p)}$

Fuente: Doping S *et al.*, 2005.

Los parámetros fueron calculados por el método de Marquardt, en dos pasos, desde el nivel inferior (subreacciones con grupos B, C y D), hasta el superior (grupo A).

Una comparación de los valores obtenidos en condiciones experimentales diferentes y los computados en el modelo demostraron que el modelo propuesto predice la distribución de las concentraciones en buena medida. La Tabla 3 muestra los valores de los parámetros estimados en el modelo.

Figura 1. Esquema de los cuatro grupos de péptidos de BSA hidrolizados con tripsina.



Hidrólisis enzimática en reactores de membrana

En los últimos años ha surgido un gran interés en el sector académico e industrial por el uso de reactores de membrana, que presentan una serie de ventajas en relación con los procesos batch tradicionales (Figura 2).

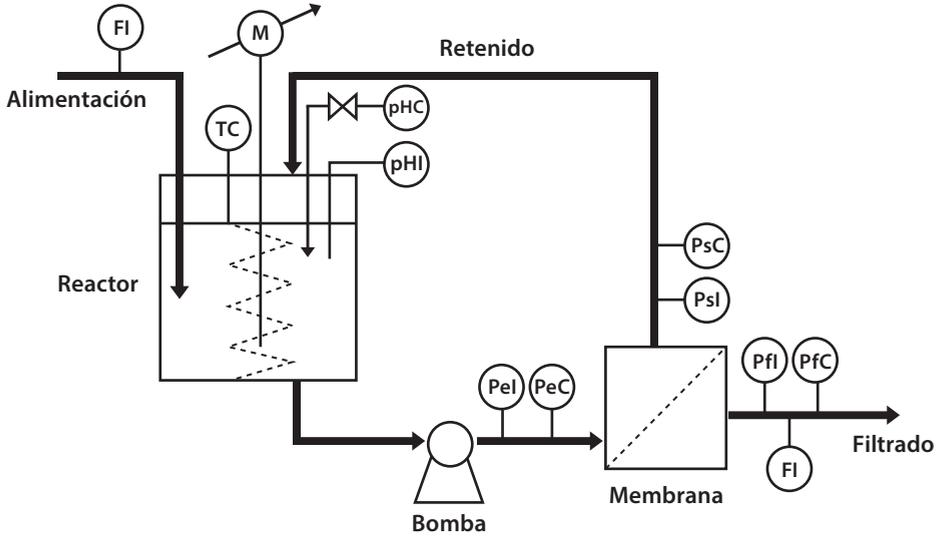
Numerosos trabajos se han desarrollado en reactores de este tipo en el estudio sobre péptidos bioactivos. En una revisión de Prieto (2007) se destacan trabajos como los de Kapel *et al.* (2003-2006), que emplearon un reactor de membrana para la producción continua de un hidrolizado rico en péptido opioide LVV-hemorfina-7, a partir de hemoglobina y pepsina porcina. Guadix *et al.* (2006), en un reactor continuo con membrana de poliéstersulfona, logró reducir en un 99.97 % la alergenicidad de hidrolizados de lactosuero (Prieto, 2007).

Tabla 3. Resultado de los parámetros cinéticos estimados con el modelo de agrupamiento (unidades de k son min⁻¹).

Reaction	Reaction constant	30 °C	40 °C	50 °C
A → B	k ₁	2,6465	4,6171	10,2481
A → C	k ₂	0,2898	0,4578	0,8737
A → D	k ₃	0,06293	0,1107	0,1830
B → C	k ₄	0,5613	0,8213	1,382
B → D	k ₅	0,2484	0,4268	0,852
C → D	k ₆	0,6030	0,9085	1,3517

Fuente: Doping S *et al.*, 2005.

Figura 2. Esquema general de un reactor de membrana



Fuente: Prieto, 2007.

Guadix (2002), hidrolizando proteínas de lactosuero en un reactor de membrana, propone un modelo que considera la reactividad y la accesibilidad de los enlaces susceptibles de ser hidrolizados por la proteasa, representado en la forma general por la ecuación (9). Define a estos factores de reactividad y accesibilidad, expresiones que están en función del grado de hidrólisis y el número de enlaces peptídicos de la proteína.

Prieto (2007), a partir del ajuste de un modelo cinético de desactivación enzimático de primer orden y cinética de hidrólisis de orden cero, determinó los parámetros para optimizar la mínima cantidad de enzima a emplear en un reactor semicontinuo de membrana. Por otro lado, Prieto *et al.* (2007) propusieron un modelo en el que experimentalmente comprobaron una hidrólisis de orden cero y desactivación enzimática de se-

$$S_0 \frac{d(DH)}{dt} = KF_{reactividad} F_{accesibilidad} (DH_{max} - DH)$$

(9)

gundo orden, en un sistema Lactoalbumina-subtilisina (Protex 6L), logrando la optimización de un reactor cíclico de membrana y el ahorro de hasta un 44% de enzimas, comparado con un reactor de operación batch.

Conclusión

El interés surgido por las diferentes aplicaciones evidenciadas en los hidrolizados enzimáticos de proteína ha generado gran expectativa, tanto en el sector académico como en el industrial. Por lo tanto, se hace necesario que los estudios relacionados con hidrólisis enzimáticas de proteínas vayan más allá de la determinación de condiciones óptimas de trabajo. Esto implica abordar la complejidad de las reacciones de hidrólisis proteicas desde el enfoque del modelamiento de la cinética de reacción, pues factores útiles para el dimensionamiento de reactores industriales, predicción, descripción y control del comportamiento de las variables que interactúan en el proceso, como temperaturas, relación enzima-sustrato, pH, agitación, entre otras, suelen no ser analizados con suficiencia. Mientras que un modelo podría abarcar en forma más amplia ciertas variables y brindar herramientas de gran valor en el análisis de los sistemas. Aclarando que si un modelo es muy simple puede representar insuficientemente un proceso, y cuando es muy complejo, se hace difícil analizarlo estadísticamente con suficiente precisión.

Referencias bibliográficas

- Adler-Nissen, J.** (1986). Relationship of structure to taste of peptides and peptide mixtures, en: Feeney R. E., Whitaker J. R. (Eds.). *Protein tailoring for food and medical uses*, pp. 97-122.
- Badui, S.** (2006). *Química de los alimentos* (4ª. ed.). México: Person Ediciones.
- Barros, R. and Malcata, X.** (2004). A kinetic model for hydrolysis of whey proteins by cardosin A extracted from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 88, 351-359.
- Barros, R. y Malcata, X.** (2002). Modeling the Kinetics of Whey Protein Hydrolysis Brought about by Enzymes from *Cynara cardunculus*. *J. Agric. Food Chem*, 50, 4347-4356.
- Benítez, R.** (2007). Hidrólisis enzimática de la proteína del hueso de cerdo, propiedades funcionales y usos del hidrolizado [Ph.D. Thesis]. España, Universidad de Lleida.
- Benítez, R. y Ibarz, A.** (2008). Pagan J. Protein hydrolysates: processes and applications. *Acta Bioquím Clín Latinoam.*, 42, 227-236.
- Bernardini, R. D. et al.** (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124, 1296-1307.
- Camacho, F., González, P., Páez, M., Márquez, M. C., Fernández, V.** (1993). Hidrolisis de caseína con Alcalasa. *Esp Cienc Tecnol Alimen*, 33, 59-70.
- Cheison, S., Wang, Z. y Xu, S. Y.** (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*, 2 (283), 45-56.
- Chen, J. et al.** (2007). Preparation of antihypertensive peptides from rice protein by enzymatic hydrolysis and its characteristics. *Trans., Chinese Soc. Agric.*, 23, 210-213.

- Daoud, R. et al.** (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 26, 713-719.
- Deqing, S., Zhimin, H., Wei, Q.** (2005). Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin. *Process Biochemistry*, 5 (40), 1943-1949.
- Ferreira I. M. P. L. V. O. et al.** (2007). Preparation of ingredients an ACE-inhibitory peptide tryptic hydrolysis of whey protein concentrates. *International Dairy Journal*, 17, 481-487.
- Girón-Calle, J., Alaiz, M. y Vioque, J.** (2010). Effect of chickpea (garbanzo) protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. *Food Research International*, 43, 1365-1370.
- Gomes, I. et al.** (2010). Hemoglobin-derived Peptides as Novel Type of Bioactive Signaling Molecules. *The AAPS Journal*, 12 (4), 658-669.
- González-Tello, P., Camacho, F., Jurado, E., Páez, M. P., Guadix, E. M.** (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proteins. I. Kinetic model. *Biotechnol Bioeng*, 44, 523-528.
- Guadix, A.** (2002). Producción en reactores de membranas de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral. [PhD Thesis]. España, Universidad de Granada.
- Guadix, A.** (2002). *Producción en reactores de membranas de hidrolizados enzimáticos de proteínas lácteas para nutrición enteral*. Granada, España: Universidad de Granada.
- Guadix, A. et al.** (2000). Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins. *Ars Pharmaceutica*, 41, 79-89.
- Guérard, F. et al.** (2010). Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. *J. Sci. Hal. Aquat.*, 2, 21-27.
- Hartman, R. y Meisel, H.** (2007). Food derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 163-169.
- Hyun, C. K. y Park, K. J.** (2002). Antigenotoxic effects of the peptides derived from bovine blood plasma proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 633-638.
- Hyun, C. K. y Shin, H. K.** (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry*, 36, 65-71.
- Je, J. Y. et al.** (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42, 1266-1272.
- Kannana, A. et al.** (2010). Human cancer cell proliferation inhibition by a pentapeptide isolated and characterized from rice bran. *Peptides*, 31, 1629-1634.
- Kim, S. Y., Je, J. Y. y Kim S. K.** (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *J. Nutr. Biochem.*, 18, 31-38.
- Kong, X., Zhou, H. y Qian, H.** (2007). Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chem.*, 101, 615-620.
- Korhonen, H. y Pihlanto, A.** (2003). Bioactive peptides: novel applications for milk proteins. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 3, 133-144.
- Lamsal, B. P., Jung, S. y Johnson, L. A.** (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT - Food Sci. Technol.*, 40, 1215-1223.
- Liu, Q. et al.** (2009). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118, 403-410.
- Liu, Q. et al.** (2009). Free radical scavenging activity of porcine plasma protein

- hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. *Food Science and Technology*, 42, 956-962.
- Mak, P. et al.** (2004). Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides*, 25, 1839-1847.
- Margot, A., Flaschel, E. y Renken, A.** (1997). Empirical kinetic models for tryptic whey-protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 32, 217-223.
- Márquez, M. C, Fernández, V.** (1993). Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: mechanism and kinetics. *Proc Biochem*, 28, 481-490.
- Márquez, M. y Vázquez, M.** (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, 35, 111-117.
- Márquez, M., Vázquez, M.** (1999). Modeling of enzymatic protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, October;1-2 (35), 111-117.
- Martínez, O. y Martínez, E.** (2006). Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp*, 21 (Supl. 2), 1-14.
- Moller, N. P. et al.** (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *Eur J Nutr.*, 47, 171-182.
- Mukatata, S. et al.** (1992). Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems: enzymatic hydrolysis of casein proteins. *Biotech. Bioeng*, 40, 195-206.
- Nedjar, N.** (2006). Isolation and characterization of four antibacterial peptides from bovine hemoglobin. *Peptides*, 27, 2082-2089.
- Nedjar, N.; et al.** (2008). Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial Peptides. *Peptides*, 29, 969-977.
- Paraman, I. et al.** (2007). Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein, *Cereal Chem.*, 84, 343-349.
- Paul, M. y Somkuti, G. A.** (2010). Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 37, 173-178.
- Peng, X. et al.** (2010). Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal*, 20, 360-365.
- Prieto, C.** (2007). *Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas*. Granada, España: Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Granada.
- Prieto, C. y col.** (2007). A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. *Journal of Food Engineering*, 78, 257-265.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. y Aranha, C.** (2004). Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 536-547.
- Rohwer, J., Hanekom, A., Hofmeyr, J.** (2007). *A Universal Rate Equation for Systems Biology*. Beilstein-Institut.
- Ruiz-Henestrosa, V. P. et al.** (2007). Limited enzymatic hydrolysis can improve the interfacial and foaming characteristics of beta-conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* 55, 1536-1545.
- Tardioli, P. et al.** (2005). Kinetic model of the hydrolysis of polypeptides catalyzed by Alcalase immobilized on 10% glyoxyl-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, 36, 555-564.
- Trusek-Holownia, A.** (2008). Production of protein hydrolysates in an enzymatic membrane reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 2 (39), 221-229.
- Wasswa, J. et al.** (2007). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin, *Food Chem.*, 104, 1698-1704.
- Wei, Q. y Zhimin, H.** (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: mechanism and kinetic model. *Front. Chem. China*, 3(1), 308-314.

Wiley, J. and Sons (editors). (1986). *Chemical reaction engineering* (second edition). New York.

Yin, S. et al. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate. *Food Chem.*, 106, 1004-1013.

Yin, S. et al. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate. *Food Chem.*, 106, 1004-1013.

You, S. J. et al. (2010). Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International*, 43, 848-855.

Zhu, K.; Zhou, H. y Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41, 1296-1302.