

**Identificación de la efectividad catalítica de diferentes proteasas y la combinación de estas,
para la obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas de lombriz roja californiana
(Eisenia fetida)**

Angela María Noreña Mora

Proyecto de investigación para optar por el título de Ingeniería de Alimentos

Asesor

Leidy Johanna Gómez Sampedro

Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería ECBTI
Ingeniería de Alimentos

2022

Dedicatoria

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios, por darme la fortaleza de seguir adelante con mis sueños, a mis padres por su apoyo constante e incondicional, a todas las personas cercanas que me apoyaron durante todo este proceso de estudio.

Agradecimiento

Agradezco principalmente a Dios, a la tutora Leidy Johanna Gómez Sampedro que aportó con su gran conocimiento y ayuda a mi trabajo de grado, de igual manera al grupo de Nutrición y tecnología de alimentos de la Universidad de Antioquia por la disposición de infraestructura y equipos para el desarrollo de los ensayos, a mi institución UNAD, y todas las personas que me apoyaron para la culminación de este proyecto.

Resumen

La hidrólisis enzimática de proteínas es una técnica biotecnológica que ha cobrado gran importancia, dado que constituye una estrategia efectiva para la obtención de hidrolizados y péptidos con propiedades tecno funcionales y biológicas. Dichas propiedades dependen de muchos factores, siendo uno de los más importantes el tipo de enzima utilizada para la catálisis de la reacción. El presente trabajo tuvo como propósito identificar la efectividad de diferentes proteasas comerciales, en el proceso de hidrólisis de proteínas de lombriz roja californiana (LRC). Para esto, se evaluó la actividad catalítica de tres proteasas de diferentes características: Alcalasa 2.4L, Flovourzyme y Neutrase, y se realizó el proceso de hidrólisis de LRC con cada enzima, bajo la misma relación enzima/sustrato y las condiciones de reacción óptimas para cada enzima. Cada reacción se realizó durante 60 minutos después de lo cual se evaluó el grado de hidrólisis (GH) para identificar la eficiencia catalítica de las enzimas sobre este sustrato. Los resultados mostraron que la enzima con mayor eficiencia en el proceso de hidrólisis de LRC fue la Alcalasa 2.4L, con la cual se alcanzó un GH de 13,02%, más de dos veces mayor que el alcanzado con las otras dos enzimas. Por otro lado, se realizó un proceso de hidrólisis secuencial combinando la Alcalasa con las Flovourzyme y Neutrase, obteniéndose como resultado que el GH se incrementa sustancialmente, alcanzándose un valor de hasta 27%. En conclusión, las proteínas de LRC pueden ser hidrolizadas eficientemente con una endoproteasa como la Alcalasa 2.4L, y el proceso se optimiza al realizar una hidrólisis secuencial, lográndose obtener hidrolizados que podrían ser utilizados en la industria alimentaria.

Palabras clave: Alcalasa 2.4L, Actividad catalítica, Proteólisis

Abstract

The enzymatic hydrolysis of proteins is a biotechnological technique that has gained great importance, since it constitutes an effective strategy for obtaining hydrolysates and peptides with techno-functional and biological properties. These properties depend on many factors, one of the most important it is enzyme type used to the reaction. The purpose of this work was to identify the effectiveness of different proteases in the hydrolysis process of Californian red worm (LRC) proteins. For this, the catalytic activity of three proteases with different characteristics was evaluated: Alcalase 2.4L, Flovourzyme and Neutrase, and the LRC hydrolysis process was carried out with each enzyme, under the same enzyme/substrate ratio and the optimal reaction conditions for each enzyme. Each reaction was carried out for 60 minutes after which the degree of hydrolysis (DH) was evaluated to identify the catalytic efficiency of the enzymes on this substrate. The results showed that the enzyme with the highest efficiency in the LRC hydrolysis process was Alcalase 2.4L with which a DH of 13.02% was achieved, twice higher than DH achieved with the other two enzymes. On the other hand, a sequential hydrolysis process combining Alcalase with Flovourzyme and Neutrase was carried out, obtaining that GH increases substantially, reaching a value of up to 27%. In conclusion, LRC proteins can be efficiently hydrolyzed with an endoprotease such as Alcalase 2.4L, and the process is optimized by performing sequential hydrolysis, obtaining hydrolysates that could be used in the food industry.

Keywords: Alcalase 2.4L, Catalytic activity, Proteolysis

Tabla de Contenido

Introducción	10
Planteamiento del Problema	12
Justificación	14
Marco Teórico.....	15
Lombriz roja Californiana.....	15
Enzimas utilizadas	17
Alcalasa 2,4l	18
Neutrasa.....	19
Flavourzyme.....	19
Péptidos Bioactivos.....	20
Objetivos	22
General.....	22
Específicos	22
Metodología	23
Manejo del Sustrato	23
Análisis de Proteína	23
Actividad Catalítica de las Proteasas	23
Proceso de hidrólisis enzimática.....	24
Hidrólisis Secuencial con Combinación de Enzimas	24
Grado de hidrólisis (GH)	25
Resultados y Discusión.....	26
Evaluación de las Enzimas Proteolíticas Comerciales.....	26

Proceso de hidrólisis de LRC.....	27
Hidrólisis Secuencial con Combinación de Enzimas	29
Conclusiones.....	31
Bibliografía	32

Lista de Tablas

Tabla 1 *Condiciones de pH y T para cada proteasa* 24

Tabla 2 *Actividad catalítica de las proteasas evaluadas* 26

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Curva de GH en función del tiempo para la hidrolisis de LRC con las diferentes proteasas</i>	28
Figura 2 <i>Curva de GH en función del tiempo para la hidrolisis de LRC con las difentes proteasas combinadas</i>	30

Introducción

En la actualidad de la industria alimentaria, se está encaminando a la innovación de alimentos funcionales, debido a que el consumidor busca productos saludables que aporten beneficios para a su salud, más allá del valor nutricional que contengan. Para lograr el desarrollo de este tipo de alimentos, muchas investigaciones se han centrado en la búsqueda de compuestos bioactivos, estos compuestos están presentes en diferentes alimentos y subproductos de la industria alimentaria como se evidencia en varias investigaciones realizadas. (Pacheco, 2019). Entre estos compuestos se resaltan los péptidos biológicamente activos, los cuales pueden obtenerse a partir de hidrólisis de las proteínas y que muestran efectos marcadamente positivos a la salud como antihipertensivos, antioxidantes o anticancerígenos por mencionar algunos ejemplos (Glomm et al., 2021; Gómez y zapata, 2022; Herrera Chalé, 2014).

La hidrólisis enzimática de proteínas es una técnica biotecnológica que ha cobrado gran importancia, dado que, a diferencia de otras técnicas usadas para la hidrolisis de proteínas, la hidrolisis enzimática permite obtener hidrolizados con péptidos específicos y preservados (Tavano, 2013). En general, se han reportado que se pueden obtener péptidos bioactivos a partir de casi cualquier tipo de proteínas (Gianfranceschi et al., 2018; Gomez et al. 2020; Villamil et al., 2017), por lo que es muy importante continuar la exploración de nuevas fuentes de proteínas que tengan potencial para producir compuestos bioactivos.

En el presente proyecto se estudió el proceso de hidrolisis enzimática de una especie de lombriz domesticada denominada lombriz roja californiana (LRC) (*Eisenia foetida*), la cual se caracteriza por tener un gran perfil nutricional con un elevado contenido de proteínas que proporciona aminoácidos esenciales, minerales y una cantidad adecuada de ácidos grasos omega 3, y un amplio espectro de vitaminas (Bahadori et al., 2017). Así, se realizó el proceso de

hidrólisis de las proteínas de LRC con tres proteasas de diferentes características: Alcalasa 2.4L, Flavourzyme y Neutrase, y una combinación de ellas.

Los resultados mostraron que la Alcalasa 2.4L presentó una mejor actividad catalítica, alcanzándose un GH de %13,02 en 60 min. Las enzimas Neutrasa y Flavourzyme presentan una actividad catalítica mucho menor, presentando solo un GH de 3,31 y 6,40%, respectivamente.

Por otro lado, se identificó que la hidrólisis secuencial logró incrementar sustancialmente el GH, alcanzándose valores de 27,5 y 21,3% para los procesos Flavourzyme- Alcalasa y Neutrasa- Alcalasa, respectivamente.

Planteamiento del Problema

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud - OMS, la alimentación y la nutrición son factores muy importantes para promover y mantener una buena salud a lo largo de toda la vida y están bien establecidas sus funciones como determinantes de enfermedades crónicas no transmisibles, lo que las convierte en elementos esenciales para las actividades de prevención. (2017).

Por esta razón se ha realizado investigaciones en la búsqueda alimentos y nuevas alternativas que brinden al consumidor productos para sus necesidades, estos han sido llamados alimentos nutracéuticos, complementos alimenticios y alimentos funcionales. (Barberá, et. al. 2011)

Los índices de muertes por enfermedades debido a malos hábitos alimenticios aumentan y consumo de alimentos altos en grasas saturadas, alimentos procesados aumentan cada año, la industria alimentaria tiene el desafío de buscar alternativas alimenticias que generen beneficios para la salud, por esta razón los péptidos bioactivos son una opción que puede suplir esta necesidad del consumidor (Barberá, et. al. 2011)

La lumbricultura representa una alternativa interesante para la producción de una nueva fuente de proteína de calidad nutricional. Además, es una técnica amigable con el medio ambiente dado que permite el uso de residuos biodegradables de la industria agropecuaria, y contribuye al aprovechamiento de los residuos aportando a la conservación del medio ambiente (Martinez, 2008).

La lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) es utilizada en su mayoría en la elaboración de abono orgánico, según Verified Market Research (VMR), el mercado global de vermicomposta se valoró en USD 63,55 millones en 2019 y se cree que alcance los USD 222,42

millones para 2027, con un crecimiento anual del 16,74 % entre 2020 y 2027 (VMR, 2021).

Aunque la carne de lombriz ha sido muy estudiada, en Colombia no ha sido lo suficientemente aprovechada, en el país se llegan a producir 800.000 toneladas por año, de estas 700.000 son compost y sólo 100.000 lombrinaza («En Colombia la lombricultura es un negocio aún reducido y que está por desarrollarse», 2015). En algunos países como Filipinas, Chile, Estados Unidos, Italia se utiliza en preparados alimenticios o como suplemento alimentario con grandes beneficios en el organismo. Este es un potencial alimento que puede llegar a complementar la dieta del consumidor y mejorar el funcionamiento de su organismo («Sea feliz... coma lombriz», 1991), por lo que es importante buscar alternativas para el aprovechamiento de este tipo de materia prima.

En este sentido se plantea la siguiente pregunta de investigación

¿Cuál es la enzima más eficiente para el proceso de hidrólisis enzimática de proteínas de lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*)?

Justificación

En la actualidad una problemática general es el manejo de residuos agroindustriales, que afectan el medio ambiente, por lo cual es necesario encontrar alternativas de aprovechamiento con el fin de mitigar esta problemática, la lombricultura es una técnica biológica que permite por un lado el aprovechamiento de residuos orgánicos producidos en la cadena agroalimentaria, y por otro lado la producción de proteína de calidad nutricional, que puede convertirse en una fuente potencial de compuestos bioactivos (Alvídrez et. al., 2002).

Una de las técnicas más utilizadas para la obtención de péptidos bioactivos es la hidrólisis enzimática la cual se realiza normalmente en un reactor, con control de agitación, pH, temperatura y tiempo del proceso. A partir de bioactivos se pueden formular alimentos funcionales, que pueden aportar significativamente en la dieta de la población generando un beneficio para la salud del consumidor. Este tema en la industria de alimentos a tenido gran acogida en los últimos años, convirtiéndose en un nicho de mercado significativo y de aprovechamiento de nuevas fuentes de proteína como es la lombriz californiana.

Por medio de este trabajo se busca encontrar el proceso de hidrólisis más adecuado para obtener compuestos bioactivos a partir de proteínas de lombriz californiana para su utilización en la industria alimentaria.

Marco Teórico

Lombriz roja Californiana

La lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*) es una especie de lombriz de color rojo oscuro o violeta rojizo, su forma se caracteriza por un gradiente antero-posterior y dorso-ventral, cuyo cuerpo está dividido en anillos o metamerismos, que son visibles a simple vista, es especie puede medir entre 8 a 10 cm de largo y 3-5 mm de diámetro. Pertenece al Orden de Haplotaxida de la familia Lumbricidae su nombre científico: *Eisenia fétida* su nombre común: Lombriz roja californiana. (Lara, 2022)

Las lombrices de tierra contribuyen de manera importante en los ecosistemas terrestres. Han sido reconocidos como los más importantes ingenieros de ecosistemas del suelo. Son muy importantes en agricultura, porque enriquecen el suelo en donde habitan, proporcionándole nutrientes y aireación (Lara, 2022).

Los beneficios de su aprovechamiento son acelerar el proceso de descomposición de materiales biodegradables, son un medio eficaz para la descontaminación ambiental, ayuda a evitar la erosión de los suelos, aporta a la nutrición de las plantas, reemplaza gran parte del abono químico y sirve como alimento para aves, peces, cerdos y humanos.

En el país, según datos de Asociación Colombiana de Compostadores (Asocompost), hay cultivos de lombriz roja desde la costa norte hasta el sur en su mayoría se utilizan para autoconsumo asociados a palma africana, banano, frutales, pastos, café, hortalizas, entre muchos otros. Estos cultivos de lombriz roja son para desarrollo de compostaje. (2022).

En América Latina los principales productores son Chile, Brasil, Colombia, Argentina y Ecuador. En donde se encuentran grandes explotaciones industriales de lombriz roja californiana. El país que ha tenido mayor producción y aprovechamiento de la harina de lombriz para

consumo humano ha sido Filipinas, por lo que tiene ventaja sobre la harina de pescado en cuanto a la ausencia de olor y sabor que la hace competitiva tanto en calidad como en precio.

La lumbricultura puede considerarse como una actividad de doble propósito, producción de abono orgánico y elaboración de harina de lombriz como alimento rico en proteínas. La composición de la harina de lombriz, con un contenido significativo de proteínas de valor biológico, hace que ésta pueda incorporarse parcialmente para enriquecer los alimentos de consumo animal. El contenido de proteína de la harina de lombriz supera a la harina de pescado y harina de soja, por lo general > 50 % sobre base seca, dependiendo de la fuente documental consultada y de la especie de anélido (Ovalles, et. al. 2017).

Mediante la hidrólisis enzimática se puede obtener hidrolizados proteicos que pueden ser una alternativa de aprovechamiento en la obtención de péptidos funcionales, obtención de productos con valor agregado y tratamiento de residuos agroindustriales. La hidrólisis enzimática de proteínas transcurre a través de un conjunto de etapas en serie, dando péptidos de tamaño decreciente: Proteínas → proteosomas → peptonas → péptidos → aminoácidos. Se trata de un conjunto de reacciones simultáneas de rotura de enlaces, con distintas especies cargadas en equilibrio. Se propone un proceso de hidrólisis constituido por tres reacciones consecutivas. Primero la formación de un complejo enzima- proteína, después la ruptura del enlace peptídico dando como resultado la liberación de un péptido, finalmente el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede iniciarse nuevamente sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno de ellos (Benítez, et. al. 2008).

Los compuestos bioactivos son importantes ya que tienen beneficios antioxidantes, antihipertensivos, antiinflamatorios e hipocolesterolemiantes de los fitoquímicos. Además de efectos antimicrobianos, antihipertensivos, antitrombóticos, inmunomoduladoras y de transporte

de minerales a los péptidos lácteos (García, 2020)

En estos procesos de hidrólisis son fundamentales factores como el pH óptimo, temperatura de las diferentes enzimas utilizadas, cada enzima tiene un rango óptimo de pH y temperatura. Si en la reacción se trabaja dentro de este rango, la eficiencia de la enzima será máxima. De igual forma se necesita obtener la enzima / sustrato correcto, ya que este factor es fundamental para el tamaño de las cadenas peptídicas formadas (Cruz, 2013).

Enzimas utilizadas

Las enzimas proteolíticas se pueden obtener de fuentes animales, vegetales o microbianas; sin embargo, los dos primeros tienen ciertas limitaciones. Por ejemplo, se debe considerar el sacrificio de animales cuando se utilizan fuentes animales para extraer tales enzimas, ya que las proteasas se producen comúnmente en tejidos y órganos. En fuentes vegetales, las proteasas se pueden obtener de la cáscara o de la pulpa, pero están influenciadas por la viabilidad, el cultivo, las condiciones climáticas y los largos procesos de extracción. Por lo tanto, se prefiere obtenerlos de fuentes microbianas, dado que las enzimas producidas son más estables, el proceso de producción más rápidos, requisitos nutricionales simples y los microorganismos pueden manipularse genética y ambientalmente para generar las características deseadas (Cruz-Casas et al., 2021).

La clasificación de las enzimas proteolíticas está dada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las proteasas se ubican en el grupo 3, subgrupo 4 en donde se encuentran las hidrolasas. Las proteasas se clasifican según su estructura y componentes, el tipo de reacción catalizan, sitio activo y naturaleza química. Según el sitio catalítico, las proteasas se clasifican en dos grupos principales, incluidas las exoproteasas y las endoproteasas.

Las exoproteasas se refieren a las proteasas que corta el aminoácido terminal y se clasifican en carboxipeptidasas y aminopeptidasas, según actúen en el C-terminal libre de la cadena polipeptídica o en el N-terminal libre del sustrato polipeptídico, respectivamente. Las endopeptidasas se caracterizan por llevar a cabo la hidrólisis en los enlaces peptídicos de las regiones internas de la cadena polipeptídica. Estas enzimas son industrialmente más importantes que las exopeptidasas y se clasifican según la especificidad del sustrato, mecanismo catalítico, estructuras tridimensionales y por los residuos de aminoácidos presentes en su sitio activo (Ahangari et al., 2021).

Alcalasa 2,4I

Esta enzima se produce por fermentación de *Bacillus licheniformis* seguida de purificación y formulación. Puede hidrolizar eficazmente las proteínas dentro de un amplio rango de temperatura y pH. Trabaja a temperaturas entre 45°-65°C y pH entre 7,5-9,5, dependiendo del tipo de sustrato. La Alcalasa, es una endopeptidasa de tipo serina, hidroliza las proteínas de forma muy eficiente para producir péptidos o aminoácidos, Esta enzima ha sido utilizada para la hidrólisis enzimática de diferentes productos en la búsqueda de compuestos bioactivos, como es el caso de proteínas en plasma bovino (Figuroa, et. al. 2016), en leguminosas como lentejas y judías (García,2016) teniendo excelentes resultados en el grado de hidrólisis.

Se puede evidenciar en varias investigaciones que la enzima por si sola tiene un alto porcentaje de hidrólisis, además que su combinación con otras enzimas

incrementa estos porcentajes como es el caso de la investigación realizada por (Ochoa, 2017). Donde se evidencio que “los mejores resultados fueron obtenidos con la combinación de enzimas Neutrasa/Alcalasa (180 min de reacción) alcanzando un IC50 de 0.12 mg de proteína/ml, a esta condición un GH de 42.19 por ciento y un valor ABTS+ de 2.12 μ mol TE/mg

de proteína”

Neutrasa

Esta enzima proteolítica producida por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Bacillus subtilis*, con temperaturas de trabajo entre 45°-65°C y pH 7,5-9,5. Es recomendable para la extracción de proteína animal, esta enzima es una endoproteasa de amplio espectro de alta calidad. Proporciona una hidrólisis suave. Amenudo se usa de forma aislada en el proceso de hidrólisis, pero también se puede combinar con una exoproteasa para obtener beneficios de sabor superiores. (novozymes,s.f).

Es una enzima de considerable interés debido a su amplia variedad de posibles aplicaciones, por ejemplo, en la producción de proteínas para alimentos funcionales y para la mejora de la textura y propiedades sensoriales de los productos lácteos. (SOUSA, 2014)

Esta enzima ha sido utilizada en varias investigaciones teniendo resultados óptimos, como es recomendado en su ficha técnica, puede ser combinada con una exoproteasa con el fin de potenciar el grado de hidrolisis.

Flavourzyme

Es un complejo de proteasa fúngica y peptidasa producido por fermentación sumergida de una cepa seleccionada de *Aspergillus oryzae*, contiene tanto actividades de endoproteasa como de exopeptidasa, pH de trabajo entre 5,0-8,0 y temperatura entre 50–60°C. (Zapata, et. al. 2019).

La utilización de esta enzima combinada con la enzima Alcalasa ha mostrado resultados favorables aumentando el grado de hidrolisis.

“El uso de una combinación de enzimas en la hidrólisis secuencial puede producir péptidos bioactivos con actividades antioxidantes e inhibidoras de la ECA mejoradas. Alcalase conduce a la producción de péptidos de sabor amargo que pueden alterarse aplicando

Flavourzyme para hidrolizar los péptidos anteriores a menos péptidos amargos”. Esto se realizó en hidrolizados de proteína de lenteja (Rezvankhah, et. al. 2021).

En investigaciones realizadas para la obtención de compuestos bioactivos la flavourzyme se combina con otras proteasas. Cómo fue realizado en la obtención de compuestos bioactivos en el pez anchoveta. “En este proceso de hidrólisis se utilizó primero una endopeptidasa (Protamex) seguido de una exopeptidasa (Flavourzyme 1000L) fue la que presentó el mayor fraccionamiento de la proteína de anchoveta medida a través de oBx ref. y GH%. En el hidrolizado de proteína de anchoveta en polvo destacó el alto contenido de lisina, aminoácido esencial de importancia para la nutrición y relacionado con el desarrollo infantil” (Acero, et. al. 2021)

Péptidos Bioactivos

De acuerdo con (Vioque, et. al. 2005) “Un componente bioactivo sería aquel compuesto químico que ejerce un efecto beneficioso para alguna función corporal del individuo produciendo una mejora en su salud y bienestar o reduciendo un riesgo de enfermedad”. Esta actividad antioxidante de péptidos bioactivos puede ser atribuida a su capacidad para la eliminación de radicales, la inhibición de la peroxidación lipídica y a las propiedades de quelación de iones metálicos.

En los últimos años, debido a la gran relevancia que estos péptidos han obtenido en el mercado, se han desarrollado técnicas para la obtención de nuevos péptidos bioactivos a partir de proteínas alimentarias mediante digestión enzimática in vitro, empleando enzimas proteolíticas de origen microbiano. Es más, en estudios recientes se han obtenido péptidos modificados, diseñados a partir de péptidos naturales, con el fin de incrementar la actividad de estos últimos. (Mulero, et. al. 2011).

Entre las propiedades beneficiosas de los péptidos bioactivos se encuentran las antimicrobianas e inmunomodulantes, estas se han estudiado ampliamente en la leche y productos lácteos. Este efecto parece estar relacionado con la carga neta positiva de estos péptidos, que se organizan estructuralmente y provocan la formación de canales iónicos en la membrana de los microorganismos, alterando su permeabilidad y provocando la muerte celular. (Mulero, et. al. 2011).

También se ha podido identificar los péptidos antioxidantes en varios estudios, estos péptidos actúan impidiendo que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres que con el resto de las moléculas presentes en un determinado microambiente de membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. (Mulero, et. al. 2011).

Objetivos

General

Identificar la proteasa más eficiente para el proceso de hidrólisis de proteínas de lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*).

Específicos

Evaluar la actividad catalítica de las proteasas: Alcalasa 2.4L, Flovourzyme y Neutrasa, a fin de estandarizar el proceso de hidrólisis en función de la concentración de enzima adicionada.

Obtener hidrolizados proteicos de lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*) por acción de Alcalasa 2.4L, Flovourzyme, Neutrasa, y la combinación de ellas.

Determinar el grado de hidrólisis alcanzado para cada reacción, al fin de identificar la enzima más eficiente para el proceso de hidrólisis enzimática de lombriz roja californiana (*Eisenia fetida*).

Metodología

Manejo del Sustrato

Las lombrices fueron conseguidas con el proveedor comercial Lombrices de Tenjo E.U., y transportadas en el sustrato de alimentación desde Tabio-Cundinamarca para posteriormente ser separadas y lavadas. Una vez separadas se realizó el purgado con una solución de bicarbonato al 2% y el beneficio de las lombrices con una solución salina de cloruro de sodio al 7% durante 60 min a 25°C. Finalmente las lombrices fueron conservadas en congelación hasta el proceso de hidrólisis.

Análisis de Proteína

Proteína bruta (N x 6,25) se midió siguiendo el método oficial de la AOAC Kjeldahl (AOAC 992.15).

Actividad Catalítica de las Proteasas

Se determinó mediante un análisis estándar usando caseína como sustrato, según la metodología descrita por (Cheung et al). En este análisis, una unidad de actividad es representada por una producción de color equivalente a 1 μmol de tirosina por min a pH 7,5 y 37°C. Para esto, una alícuota de 100 μL de las enzimas (1:20) se incubó con 500 μL de solución de caseína 0,65 %, durante 10 minutos a 37°C. La reacción se detuvo adicionando 500 μl de solución de ácido tricloro acético (110 mM) y la mezcla se centrifugó 7500 rpm por 10 minutos, para tomar 200 μL del sobrenadante y mezclarlos con 500 μL de Na_2CO_3 0,5 M y 100 μL del reactivo de Folin- Ciocalteu.

Esta última solución se incubó a 37°C por 30 minutos, se centrifugó a 9000 rpm por 15 minutos y la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro a 660nm. Como patrón se emplea una curva estándar de solución de Tirosina entre 0-200 mg/L.

Proceso de hidrólisis enzimática

La pasta de lombriz fue hidrolizada en un reactor de vidrio de 0.5 L, con tres proteasas diferentes (Alcalasa 2.4L, Flovourzyme y Neutrasa), bajo la misma relación enzima/sustrato (0,018 UA/g proteína), una concentración de sustrato de 15 g proteína/L y las condiciones de pH y temperatura recomendadas para cada enzima, según se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Condiciones de pH y T para cada proteasa

Enzima	pH	Temperatura
Neutrasa	7,5	47
Flovourzyme	7	48
Alcalasa 2.4L	8,5	45

El control de pH y temperatura se realizó con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un titulador automático (Titrando 842) marca (Metrohm, Suiza), operado por computador (software tiamo 1.2.1). El sistema de reacción se realizó durante 60 min para cada enzima y se mantuvo en agitación constante de 240 rpm usando un agitador magnético 801 (Metrohm, Suiza).

Hidrólisis Secuencial con Combinación de Enzimas

La pasta de lombriz fue sometida a un proceso de hidrólisis bajo las condiciones descritas anteriormente, pero usando las enzimas de forma secuencial, así:

- Hidrólisis durante 15 min con 0,0054 U de Neutrasa/g proteína, y seguidamente hidrólisis durante 45 minutos con 0,0126 U de Alcalasa/ g proteína.
- Hidrólisis durante 15 min con 0,0054 U de Flovourzyme/g proteína, y

seguidamente hidrólisis durante 45 minutos con 0,0126 U de Alcalasa/ g proteína.

Grado de hidrólisis (GH)

La reacción se controló a través del GH, expresada como la relación entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa, por unidad de peso (ht). El grado de hidrólisis se calculó con la ecuación (1), utilizando el método pH-stat (Forghani et al., 2012).

$$DH(\%) = \frac{B \cdot NB \cdot Mp}{a \cdot ht} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde B es el volumen consumido de la base en L, *Mp* es la masa de la proteína en kg, NB es la concentración de la base y *a* es el grado de disociación de los grupos amino liberados durante la reacción. Se empleó una *ht* de 8,1 Eq / Kg que fue calculado previamente por el método OPA, mientras que α y *pK* se calcularon con las ecuaciones. (2) y (3), respectivamente (Forghani et al., 2012).

$$\alpha = \frac{10^{PH} - pK}{1 + 10^{PH} - pK} \quad (2)$$

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{298} \cdot T \cdot 2400 \quad (3)$$

Resultados y Discusión

Evaluación de las Enzimas Proteolíticas Comerciales

En este trabajo se buscó identificar la eficiencia catalítica de diferentes proteasas comerciales: a) Alcalasa 2.4L, endoproteasa producida por fermentación sumergida de *Bacillus licheniformis*, con temperaturas de trabajo entre 45°-65°C y pH entre 7,5-9,5, dependiendo del tipo de sustrato; b) Neutrasa 1,5MG, endoproteasa producida por fermentación sumergida de *Bacillus subtilis*, con temperaturas de trabajo entre 45°-65°C y pH 7,5-9,5; y c) Flavourzyme 500MG, complejo de proteasa fúngica producida por fermentación sumergida de *Aspergillus oryzae*, contiene tanto actividades de endoproteasa como de exopeptidasa, pH de trabajo entre 5,0-8,0 y temperatura entre 45–60°C (Zapata, et. al. 2019).

En la tabla 2 se muestran los valores de la actividad catalítica de cada enzima expresados como UA/mL de enzima. Se puede notar que según los resultados la Neutrasa es la enzima con mayor actividad catalítica, seguida por Alcalasa, siendo la enzima de menor actividad la Flavourzyme. Es importante resaltar, que, para realizar el proceso de hidrólisis bajo las mismas condiciones, se adicionó un volumen de enzima según su actividad catalítica a fin de efectuar todos los procesos con una relación enzima/sustrato de 0,018 UA/g proteína.

Tabla 2

Actividad catalítica de las proteasas evaluadas

Enzima	Actividad catalítica (UA/mL)
Alcalasa 2.4L	1,83 ± 0,08a
Neutrasa 1,5MG	3,26 ± 0,21 b
Flavourzyme 500MG	1,38 ± 0,10 c

Nota. ^{a-c} Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas (p < 0.05).

Proceso de hidrólisis de LRC

Tras la medición de la concentración de proteína en la pasta de LRC, se logró identificar que se trata de un sustrato apropiado para el proceso de hidrólisis, dado que cuenta con una alta cantidad de proteína con una concentración de 12,2% (p/p) en base húmeda, analizada mediante el método Kjeldahl.

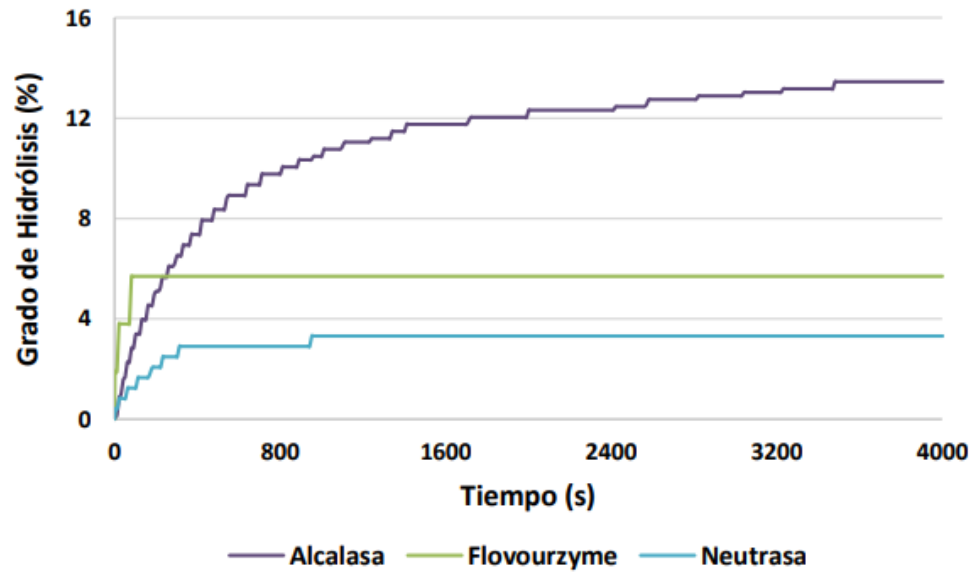
El proceso de hidrólisis está constituido por tres reacciones consecutivas.

Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), después la rotura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El proceso puede reiniciarse sobre los dos nuevos péptidos o sobre uno solo de ellos (Benitez, et. al. 2008).

En la Figura 1 se presentan las curvas de hidrólisis obtenidas para cada una de las enzimas evaluadas. Se puede notar que la Alcalasa es la enzima que presenta la mayor eficiencia para la hidrólisis de las proteínas de LRC, alcanzándose un GH de 13,02% en 60 min. Las enzimas Neutrasa y Flavourzyme presentan una actividad catalítica mucho menor, presentando solo un GH de 3,31 y 6,40%, respectivamente.

Figura 1

Curva de GH en función del tiempo para la hidrólisis de LRC con las diferentes proteasas



Estos resultados pueden atribuirse a que la Alcalasa 2.4L es una endopeptidasa poco específica, lo que permite el rompimiento de un mayor número de enlaces peptídicos (Glomm, et. al. 2021). Por otro lado, se ha documentado que proteasas alcalinas como la Alcalasa 2.4L, muestran actividades mayores que proteasas neutras, como Flavourzyme y Neutrasa (Kechaou, et al., 2009). Resultados similares han sido reportados por otros autores, quienes han definido la Alcalasa 2.4L como la enzima de mayor eficiencia para procesos de hidrólisis enzimática de proteínas de diferentes fuentes. (Benitez, et. al. 2008), (Gómez, et. al. 2020).

En este sentido, los resultados sugieren que la mejor enzima para procesos de hidrólisis de LRC es la Alcalasa 2.4L, considerando que se ha reportado ampliamente la relación existente entre hidrolizados con alto GH y una mayor actividad biológica. (Li, Y. et. al. 2018). Este mayor GH puede verse relacionado también con un incremento de los niveles de aminoácidos esenciales y una mejora en las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados (Acero, et. al. 2021).

Con base en las investigaciones realizadas en alimentos como la tilapia roja, la anchoveta y leguminosas en busca de compuestos bioactivos se puede deducir que la enzima más utilizada y con mejores resultados ha sido la Alcalasa, dando como resultado un mayor grado de hidrólisis en cada proceso (Acero, et. al. 2021; Gomez et al. 2020).

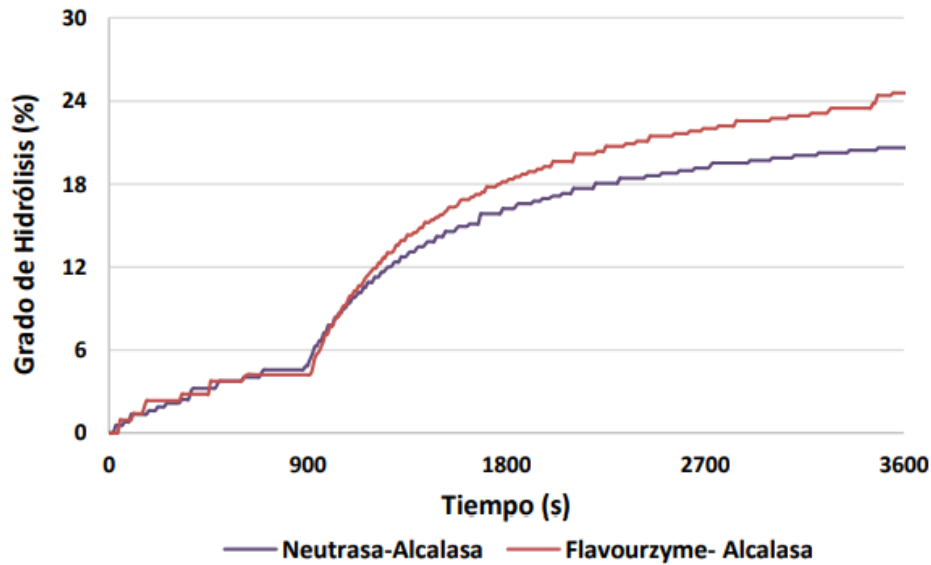
Hidrólisis Secuencial con Combinación de Enzimas

Una vez identificada la Alcalasa como la enzima que presenta mayor eficiencia para el proceso de hidrólisis de proteínas de LRC, se realizó una hidrólisis secuencial usando la combinación de la Alcalasa con la Flavourzyme y Neutrasa. Para que los procesos de hidrólisis fueran comparables, la hidrólisis secuencial se realizó de modo que el tiempo y la concentración de enzima total, se mantuviera bajo las mismas condiciones en las que se realizó el proceso con las enzimas individuales, es decir 60 min y 0,018 UA/g proteína.

En la ilustración 2 se muestra se cinética de hidrólisis obtenida con el proceso secuencial, evidenciándose claramente que el GH es muy mayor al alcanzado con las enzimas individuales, alcanzándose valores de 27,5 y 21,3% para los procesos Flavourzyme- Alcalasa y Neutrasa- Alcalasa, respectivamente.

Figura 2

Curva de GH en función del tiempo para la hidrólisis de LRC con las difentes proteasas combinadas



En la investigación realizada por (Rezvanhah, et. al. 2021) se pudo evidenciar que al realizar hidrólisis secuencial para proteína de lenteja se obtuvo un mayor grado de hidrólisis, (47,05 %) en comparación con la hidrólisis simple (8,51 % y 20,12 %).

Utilizando la combinación de Alcalsa y Flavourzyme. también se obtuvo una mayor actividad antioxidante en comparación con el hidroxitolueno butilado como antioxidante sintético.

Conclusiones

Bajos las condiciones del presente trabajo se logró identificar que la Alcalasa 2.4L es la enzima con mayor eficiencia catalítica para la hidrólisis de proteínas de LRC, alcanzado un GH 13,02%, dos y cuatro veces mayor que el alcanzado con las Flavourzyme y Neutrasa, respectivamente.

Se identificó que la hidrólisis secuencial es una estrategia útil para mejorar la reacción catalítica, dado que se logró incrementar en más del doble el GH de hidrólisis alcanzado con las enzimas individuales. Encontrándose que la combinación más eficiente fue Flavourzyme-Alcalasa con un GH de 27,5%. Estos resultados sugieren además que las proteínas de LRC son una fuente potencial de compuestos bioactivos dado que se alcanzó un GH alto en un corto tiempo de hidrólisis.

Bibliografía

- Acero, D. J. R., Sibina, J. R. O., & Ordoñez, A. M. (2021). Elaboración de un hidrolizado de proteína de anchoveta (*Engraulis ringens*) en polvo. In *Anales Científicos* (Vol. 82, No. 2, pp. 251-261). Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Alvídrez-Morales, A., González-Martínez, B. E., & Jiménez-Salas, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. *Revista salud pública y Nutrición*, 3(3).
- Barberá Mateos, J. M., & de Sanidad, C. D. M. C. (2011). Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Comité Temático de Educación Alimentaria y Nutricional. (2017). Lineamiento nacional de educación alimentaria y nutricional.
- Cruz, J. (2013). Determinación de la actividad enzimática de dos enzimas comerciales a diferentes ph, temperatura y concentración de sustrato.
- En Colombia la lombricultura es un negocio aún reducido y que está por desarrollarse. (2015). Recuperado 8 de enero de 2022, de Agronegocios website:
<https://www.agronegocios.co/agricultura/lombricultura-un-negocio-que-esta-por-desarrollar-2620901>
- Figuroa, Omar A, Zapata, José E, & Sánchez, Claudia P. (2016). Optimización de la Hidrólisis Enzimática de Proteínas de Plasma Bovino. *Información tecnológica*, 27(2), 39-52.
- García Mora, P. (2016). Producción de hidrolizados proteicos con propiedades antihipertensivas mediante proteólisis y altas presiones hidrostáticas a partir de leguminosas.
- García, Tejedor A. (2020, 11) Que son los componentes bioactivos de los alimentos y como

pueden afectar nuestra salud, BBC News Mundo, <https://www.bbc.com/mundo/noticias-54889315>

Glomm, W.R., Wubshet, S.G., Lindberg, D., Dankel, K.R., Afseth, N.K., Stenstad, P.M., Johnsen, H., 2021. Immobilized protease on magnetic particles for enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products. *LWT - Food Sci. Technol.* 152, 112327. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112327>

Gómez, L. J., Figueroa, O. A., & Zapata, J. E. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de Alcalasa® 2.4 L. *Información tecnológica*, 24(1), 33-42.

Gómez, L.J., Gómez, N.A., Zapata, J.E., López-García, G., Cilla, A., Alegría, A., 2020. Optimization of the Red Tilapia (*Oreochromis* spp.) Viscera Hydrolysis for Obtaining Iron-Binding Peptides and Evaluation of In Vitro Iron Bioavailability. *Foods (Basel, Switzerland)* 9, 883. <https://doi.org/10.3390/foods9070883>

Gómez, Leidy J., & Zapata, José E.. (2022). Caracterización fisicoquímica, tecno funcional y calidad biológica de hidrolizados de vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis* spp.). *Información tecnológica*, 33(3), 3- 14. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642022000300003>

Lara, Manuel. (13 de agosto de 2022). Lombriz roja californiana. *Revista landuum*. <https://www.landuum.com/plantae-y-fauna/importancia-ecologica-y-economica/>

Li, Y., Clark, K.A., Tan, Z., 2018. Methods for engineering therapeutic peptides. *Chinese Chem. Lett.* 29, 1074–1078. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2018.05.027>

A. Marroquín, J. Olivares, P. Diaz, L. Cruz. (Dir.) *La ciencia y las mujeres en Mexico*.

Handbooks-©ECORFAN-Mexico, Queretaro, 2019.

Martínez R., (2008). Lombricultura: una alternativa sustentable.

Massaki G., M., Pereira F. de P., Amante M., H. y Alencar M., M.E. (2011). Pseudoporphyria induced by dialysis treated with oral N-acetylcysteine. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86, 2.

<https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol25num2/articulos/antioxidantes>

Mulero Cánovas, J., Zafrilla Rentero, P., Martínez-Cachá Martínez, A., Leal Hernández, M., & Abellán Alemán, J. (2011). Péptidos bioactivos. *Clínica e investigación en arteriosclerosis*, 23(5), 219-227.

Novocymes, Alimentos y Bebidas, Neutrasa.s.f. <https://biosolutions.novozymes.com/en/animal-protein/products/neutrase>

Ochoa Pachas, K. G. (2017). Hidrólisis enzimática en una y dos etapas de la proteína de la cañihua *Chenopodium pallidicaule* Aellen., para obtener péptidos bioactivos.

Ovalles, J., Medina, A., Márquez, E., & Rial, L. (2017). Efecto del proceso de secado de la lombriz de tierra (*Eisenia andrei*) sobre el perfil aminoacídico de la harina determinado por cromatografía (CLAE)| Effect of drying process of the earthworm (*Eisenia andrei*) on amino acid profile of the meal determined by chromatography (HPLC). *Saber*, 29, 486-494.

Pacheco Tigselema, M. T. (2019). Obtención y caracterización de compuestos bioactivos procedentes de tubérculos andinos y de subproductos de la industria agroalimentaria.

Rezvankhah, A., Yarmand, M. S., Ghanbarzadeh, B., & Mirzaee, H. (2021). Characterization of bioactive peptides produced from green lentil (*Lens culinaris*) seed protein concentrate using Alcalase and Flavourzyme in single and sequential hydrolysis.

Journal of Food Processing and Preservation, 45(11), e15932.

Sea feliz... coma lombriz. (1991). Recuperado 2 de octubre de 2022, de El tiempo website:

<https://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-31283>

Sousa, G. D. S. (2014). Neutrase® immobilizada em suportes de quitosana associada a diferentes copolímeros ativados com epicloridrina.

Tamaño del mercado global de Vermicompost por producto (Lumbricus Rebellus

Vermicomposting, Africa Night Crawlers Vermicomposting y otros), por aplicación (jardinería doméstica, horticultura, campos de golf y paisajismo), por alcance geográfico y pronóstico. (2021). Recuperado 2 de octubre de 2022, de verified market research website: <https://www.verifiedmarketresearch.com/product/vermicompost-market/>

Vioque, J., & Millán, F. (2005). Los péptidos bioactivos en alimentación: nuevos agentes promotores de salud.

Zapata, J. E., Moya, M., & Figueroa, O. A. (2019). Hidrólisis enzimática de la proteína de vísceras de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*): Efecto del tipo de enzima, temperatura, pH y velocidad de agitación. Información tecnológica, 30(6), 63-72.