

CAPÍTULO 3

EFECTO DE LA FLUIDINÁMICA DEL PROCESO SOBRE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS EN LA PRODUCCIÓN PÉPTIDOS BIOACTIVOS A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

Fecha de aceptación: 01/07/2024

Leidy J. Gómez-Sampedro

Grupo GIEPRONAL, Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería, Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Medellín, Colombia

Yhoan S. Gaviria Gaviria

Grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia UdeA, Medellín, Colombia

José E. Zapata Montoya

Grupo de Nutrición y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia UdeA, Medellín, Colombia

del escalado sobre la producción de dichos péptidos. Se utilizan como sustratos modelo las proteínas de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*) para el estudio del efecto de Cg y Va, y la proteína de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) en el estudio de efecto del escalado. En ambos casos la enzima utilizada es Alcalasa 2,4L. El efecto de Cg y Va se estableció utilizando un diseño experimental central compuesto. Se determinó que la grasa actúa como inhibidor de la Alcalasa 2,4L en la hidrólisis enzimática de la proteína utilizada como modelo. A partir de esto, se plantearon experimentos para establecer el mecanismo por medio del cual se ejerce dicha inhibición. Por otro lado, quedó establecido que la velocidad de agitación también puede afectar la reacción hidrolítica, por lo que se plantearon ensayos para determinar la naturaleza de dicho efecto sobre la actividad de la enzima. Se aplicó la metodología de análisis dimensional para definir las variables fluidodinámicas relevantes en el proceso de escalado desde 0,5L (modelo) hasta 7,5 L (prototipo). Se obtuvieron 4 números adimensionales que permiten llevar el proceso desde el modelo hasta el prototipo sin diferencias significativas en las variables de salida.

PALABRAS CLAVE: hidrólisis enzimática, vísceras, *Oreochromis sp.*, alcalasa 2,4L, inhibición enzimática.

RESUMEN: Las reacciones químicas y bioquímica dependen en gran medida de las condiciones del medio fluido en el que se desarrollan. El caso de reacciones enzimáticas no es la excepción. Por tal razón en el presente capítulo se presentan resultados del estudio del efecto de la concentración de grasa (Cg) y la velocidad de agitación (Va), sobre el grado de hidrólisis (GH), en la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas que han sido reportadas como fuente de péptidos bioactivos. Además, se evalúa el efecto

EFFECT OF PROCESS FLUID DYNAMICS ON THE KINETICS OF ENZYMATIC HYDROLISIS OF PROTEINS IN THE PRODUCTION OF BIOACTIVE PEPTIDES FROM AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES

ABSTRACT: Chemical and biochemical reactions largely depend on the conditions of the fluid medium in which they occur. Enzymatic reactions are no exception. For this reason, this chapter presents the results of the study on the effect of fat concentration (C_g) and stirring speed (V_a) on the degree of hydrolysis (GH) in the enzymatic hydrolysis reaction of proteins that have been reported as a source of bioactive peptides. Additionally, the effect of scaling on the production of these peptides is evaluated. Proteins from red tilapia viscera (*Oreochromis* sp.) are used as model substrates to study the effect of C_g and V_a , and red Californian earthworm protein (*Eisenia foetida*) is used to study the scaling effect. In both cases, the enzyme used is Alcalase 2.4L. The effect of C_g and V_a was established using a central composite experimental design. It was determined that fat acts as an inhibitor of Alcalase 2.4L in the enzymatic hydrolysis of the protein used as a model. Based on this, experiments were designed to establish the mechanism by which this inhibition occurs. On the other hand, it was established that stirring speed can also affect the hydrolytic reaction, so tests were designed to determine the nature of this effect on enzyme activity. Dimensional analysis methodology was applied to define the relevant fluid dynamic variables in the scaling process from 0.5 L (model) to 7.5 L (prototype). Four dimensionless numbers were obtained, allowing the process to be scaled from model to prototype without significant differences in the output variables.

KEYWORDS: enzymatic hydrolysis, vísceras, *Oreochromis* sp., alcalase 2,4l, enzyme inhibition.

INTRODUCCIÓN

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 (Kafle et al., 2024). Una reacción de hidrólisis proteica implica la ruptura de un enlace peptídico por acción del agua y catálisis enzimática o química. En el caso de aplicación en residuos agroindustriales, esta es una reacción multi sustrato, donde una proteína es descompuesta en un número de oligómeros, los cuales son sustrato para el subsecuente proceso de hidrólisis; conllevando a cambios en las características moleculares de las proteínas y en sus propiedades (Benítez et al., 2008b; Trusek-Holownia et al., 2016). Debido al proceso de hidrólisis, las propiedades moleculares de las proteínas cambian, produciéndose disminución del peso molecular, aumento de la carga y liberación de grupos hidrofóbicos, entre otros (Habinshtut et al., 2023). Los péptidos bioactivos están encriptados en la proteína precursora, y es necesaria una proteólisis para liberarlos, después de lo cual pueden desarrollar una o varias actividades biológicas (Gianfranceschi et al., 2018). La hidrólisis química, que incluye la hidrólisis alcalina o ácida, tiende a ser difícil de controlar y conlleva a modificaciones en los aminoácidos; así las condiciones convencionales de la hidrólisis ácida puede destruir

el Trp y la hidrólisis alcalina puede reducir químicamente el contenido de Cys, Arg, Thr, Ser y/o Lys, y formar residuos de aminoácidos inusuales como lisinoalanina o lantionina (Halim et al., 2016). A diferencia de la hidrólisis química, la hidrólisis enzimática permite obtener hidrolizados con péptidos específicos y preservados (Habinshuti et al., 2023). Los hidrolizados obtenidos pueden ser fraccionados y purificados con la matriz apropiada de acuerdo con las características estructurales de interés, resultando en péptidos específicos con actividades particulares (Gianfranceschi et al., 2018).

La obtención de péptidos bioactivos sobresale como una estrategia altamente útil en la industria alimentaria, dada la creciente demanda de alimentos funcionales en el mercado. Los péptidos bioactivos son definidos como secuencias pequeñas de entre 2 y 20 residuos de aminoácidos, derivados de proteínas alimentarias, que muestran grandes beneficios para controlar enfermedades y promover la salud humana (Tu et al., 2018). Adicionalmente, por provenir de proteínas alimentarias, son considerados compuestos seguros y saludables, de bajo costo, alta actividad y fácil absorción, que incluso presentan propiedades tecnofuncionales además de la actividad biológica que poseen (Singh & Gaur, 2024). La especificidad de la actividad de los péptidos puede cubrir un alto grado de biodiversidad, dado que depende de un conjunto de características estructurales, como composición de aminoácidos, tipo de aminoácido en el C- y N-terminal, largo y peso de la cadena, propiedades hidrofóbicas, carácter de carga de los aminoácidos y estructura espacial; características que dependen en gran medida de la enzima utilizada y el grado de hidrólisis alcanzado en el proceso (Gianfranceschi et al., 2018). Los péptidos bioactivos se han investigado ampliamente en los últimos años, dado el considerable interés en el desarrollo de compuestos naturales que reemplacen los compuestos sintéticos usados hasta ahora, en este sentido, muchas investigaciones han reportado que, hidrolizados de proteína de diferentes fuentes de origen animal y vegetal, adicional a sus propiedades nutricionales, exhiben varias funciones biológicas, incluyendo antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, citoprotectora, antihipertensiva, quelantes de metales, anticoagulante, hipoglucémico, entre otros (Gianfranceschi et al., 2018; Gómez et al., 2020; Singh & Gaur, 2024).

Las condiciones de operación que más han sido estudiadas en la hidrólisis enzimática de proteínas son el pH y la temperatura (Lassé et al., 2015; Ovissipour et al., 2009; Seo et al., 2015), específicamente estas dos variables han sido estudiadas en la hidrólisis de proteínas de vísceras de tilapia roja (Zapata Montoya et al., 2018) y de lombriz roja californiana (Gaviria & Zapata, 2023). Sin embargo factores como el efecto de la agitación y la presencia de sustancias inhibitoras en la muestra, así como los efectos del escalado sobre las actividades biológicas de los hidrolizados obtenidos, han sido poco estudiados. El efecto de la agitación mecánica sobre la estabilidad de las enzimas, han sido estudiadas previamente (Caussette et al., 1997a; Charm & Wong, 1981; Colombié et al., 2001a); sin embargo, no existen reportes sobre los cambios generados en las enzimas por

efecto de la agitación mecánica en procesos de hidrólisis de proteínas. Tampoco se tienen reportes sobre la posible inhibición de la enzima asociada con el contenido de grasa que puedan tener algunos residuos alimentarios, como es el caso de vísceras de pescado. En el presente capítulo se presentan resultados del estudio del efecto de la concentración de grasa (Cg) y la velocidad de agitación (Va), sobre el grado de hidrólisis (GH), en la reacción de hidrólisis enzimática de proteínas de fuentes agroalimentarias que han sido reportadas como fuente de péptidos bioactivos como es el caso de las proteínas de vísceras de tilapia roja (*Oreochromis* sp.) y de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). Además, se evalúa el efecto del escalado sobre la reacción de hidrólisis para la producción de dichos péptidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo de materiales

Para evaluar el efecto de la fluidinámica sobre la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas, se utilizaron dos sustratos diferentes: vísceras de tilapia roja (VTR) y lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*) (LRC). Las VTR se obtuvieron en cadena de frío de la Piscícola el Gaitero (Antioquia), tomando muestras de lotes de producción diferentes. Dichas vísceras fueron homogenizadas, calentadas a 90 °C por 20 minutos para inactivar las enzimas endógenas y separar la grasa. Luego se almacenaron a -20 °C hasta el momento de la hidrólisis. En cuanto a LRC, los animales fueron separados manualmente del sustrato de cría, se lavaron con agua para remover los residuos de sustrato, se purgaron por 4 h, por inmersión en una solución de bicarbonato de sodio; posteriormente fueron enjugadas con agua para remover los restos de bicarbonato. Posteriormente, fueron sacrificadas por inmersión en solución de cloruro de sodio al 7%, por 30 min. Finalmente, la pasta obtenida se lavó con agua y se almacenó hasta el proceso de hidrólisis. En todos los ensayos se utilizó la enzima Alcalasa 2,4 L grado alimenticio (Novo Nordisk Co., Dinamarca).

Análisis proximal

El contenido de humedad, grasa, proteína y cenizas de las VTR, fueron analizados de acuerdo a los métodos de la AOAC (AOAC, 2005).

Hidrólisis Enzimática de VTR

Las hidrólisis se realizaron en un reactor de vidrio con 500 mL de solución de trabajo, con una concentración de sustrato de 4 g de proteína/L, una relación E/S de 10% (p/p), un pH de 9,5 y una temperatura de 53°C, basándose en resultados anteriores (Zapata Montoya et al., 2018). El control del pH y la temperatura se llevó a cabo con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un Titrand 842 (Metrohm, Suiza) operado por un

ordenador con el software Tiamo 1.2.1. La velocidad de agitación del sistema de reacción (V_a) y la concentración de grasa en la solución (C_g) se variaron según lo especificado en el diseño experimental (Tabla 1). La reacción fue monitoreada durante 4 horas mediante el GH, expresado como la relación entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) y el número total de enlaces peptídicos en la proteína nativa por unidad de peso (h_t) (Adler-Nissen, 1985). El método empleado para determinar el GH fue el método del pH-estado, que consiste en mantener constante el pH del medio de reacción añadiendo una solución básica, ya que a medida que la hidrólisis avanza en un medio alcalino, el grupo carboxilo terminal se disocia completamente y los protones formados se distribuyen de acuerdo con el equilibrio de protonación de los grupos α -amino liberados. La base agregada para mantener constante el pH neutraliza únicamente los protones que son sustituidos por el catión de la base (Guadix et al., 2000). El cálculo del GH se realizó según la ecuación 1 (Adler-Nissen, 1985).

$$GH (\%) = \frac{B N_B}{M_p \alpha h_t} \times 100 \quad (1)$$

En el que B representa el volumen consumido de base en L, con una concentración de N_B , M_p es la masa de la proteína en kg y α es el grado de disociación de los grupos aminos liberados en la reacción. Se empleó un h_t de 8,6 Eqv/Kg que ha sido reportado para proteínas del pescado (Adler-Nissen, 1985) y un α de 0,99, calculado en función del pH y la temperatura de reacción, de acuerdo a las ecuaciones 2 y 3 respectivamente (Forghani et al., 2012).

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

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

Diseño experimental

Se diseñó un experimento de superficie de respuestas utilizando un modelo central compuesto de cara centrada. Los factores considerados fueron C_g entre 0,1% y 1,9% (p/v) y V_a entre 240 y 1200 rpm, tomando GH como variable de respuesta. Se realizaron 13 experimentos de acuerdo con este diseño, tal como se muestra en la Tabla 1. Para generar y analizar los datos del diseño, se utilizó el software Design-Expert® 8.0.5 (Stat-Ease, EE.UU.).

Va (rpm)	Cg (%)	GH (%)
1200	1,9	8,39
720	1,9	6,65
720	0,1	9,38
1200	0,8	9,18
720	0,8	9,62
240	1,9	4,71
720	0,8	10,15
720	0,8	9,67
240	0,1	6,65
720	0,8	10,17
720	0,8	8,50
240	0,8	5,48
1200	0,1	9,48

Tabla 1. Diseño experimental planteado y resultados de la hidrólisis enzimática de VTR

Además, se realizó la optimización del modelo polinomial obtenido para determinar las condiciones de Cg y Va que maximizan el GH en un periodo de 4 horas de reacción, utilizando la técnica de modelos de superficie de respuesta. La precisión del ajuste del modelo empírico se verificó mediante los resultados experimentales, llevando a cabo tres réplicas experimentales y comparando estos resultados con los predichos por el modelo polinomial ajustado.

Actividad enzimática

La actividad catalítica se determinó utilizando la metodología descrita por Cheung et al. (2012), usando caseína como sustrato. En este análisis, cada unidad catalítica se define como la producción de color equivalente a 1 μmol de tirosina por minuto a pH 7,5 y 37°C. Para ello, se incubaron por 10 minutos a 37°C, 100 μL de la enzima con 500 μL de una solución de caseína (0,65 %). La reacción se detuvo añadiendo 500 μL de una solución de ácido tricloroacético (110 mM) y la mezcla se centrifugó. Se tomaron 200 μL del sobrenadante y se mezclaron 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 durante 30 minutos y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 660 nm. Se utilizó una curva estándar de tirosina en un rango de 0-200 mg/L como referencia.

Efecto de la agitación sobre la actividad de la Alcalasa 2,4L

Para evaluar si se genera algún daño en la Alcalasa 2,4 L, que cause su inactivación debido al efecto mecánico de la velocidad de agitación, se prepararon 500 mL de la enzima sin sustrato, diluida a una concentración de 0,017 g/mL, con un pH de 9,5 y a 53°C. La solución se sometió a agitación constante a 480, 960 y 1440 rpm durante 4 horas, tomando muestras cada 40 minutos para medir la actividad catalítica residual según la metodología descrita anteriormente. Además, para determinar si la agitación afecta la interacción de la enzima con el sustrato, se llevaron a cabo ensayos de actividad catalítica de la Alcalasa 2,4 L en un reactor de vidrio de 500 mL, usando velocidades de agitación entre 0 y 1440 rpm durante los 10 minutos de incubación de la enzima con la caseína.

Determinación del patrón de inhibición de la grasa sobre la Alcalasa 2,4L

El tipo de inhibición que la grasa presente en las vísceras ejerce sobre la Alcalasa 2,4 L se investigó realizando procesos de hidrólisis de VTR con una temperatura de 53°C, pH de 9,5 y Va de 960 rpm; utilizando Cg de 0,1%, 1,9% y 5% (p/v). Para cada Cg, se emplearon diferentes concentraciones iniciales de sustrato (S), para calcular para cada una la velocidad inicial (Vo) de la reacción, medida como la pendiente de la parte lineal inicial del gráfico de concentración de producto (P) versus tiempo, donde P se calcula como el número de enlaces peptídicos rotos según la ecuación 4. Las cinéticas de la Alcalasa 2,4 L en presencia del inhibidor (grasa) se determinaron mediante el análisis de gráficos de Lineweaver-Burk.

$$P = \frac{B N_B}{\alpha} \quad (4)$$

Actividad antioxidante del hidrolizado

- Medición de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Se realizó siguiendo el método descrito por (Re et al., 1999), en el cual 20 µL de la muestra o estándar Trolox, son mezclados con 180 µL de la solución ABTS* e incubados a 30 °C por 30 min. Después de esto se toman las medidas de absorbancia a 730 nm, en un equipo Varioskam Lux multiplier reader equipment (Thermo Fisher Scientific, USA). Como estándar para la curva de calibración se usó trolox en concentraciones entre 0 – 500 µM. Los resultados son expresados como micro moles de equivalentes Trolox por gramo de proteína hidrolizada(µmoLET/g).

- Medición de FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Se llevó a cabo con la metodología descrita por Benzie & Straint, (1996), donde 175 μL del reactivo FRAP (con TPTZ, FeCl y buffer de acetato de sodio se mezclan con 25 μL de la muestra o estándar Trolox y se incuban a 37 °C por 30 min. Después de este tiempo se lee la absorbancia a 595 nm en un Varioskam Lux multiplier reader equipment (Thermo Fisher Scientific, USA). Como estándar para la curva de calibración se usó trolox en concentraciones entre 0 – 500 μM . Los resultados son expresados como micro moles de equivalentes Trolox por gramo de proteína hidrolizada($\mu\text{molET/g}$).

- Medición de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

El ensayo ORAC se realizó según el método de Ou et al., (2001). Todas las soluciones de trabajo de AAPH (2,2'-Azobis-(2- amidinopropane), 2HCl, 2,2'-Azobis-(2-methylpropionamidine)), fluoresceína e hidrolizado de lombriz se diluyeron en tampón fosfato 75mM (pH 7,4) y la mezcla de reacción final fue de 200 mL. Las soluciones de hidrolizado (50 μL) y fluoresceína (50 μL ; 78 nmol/L de concentración final) se pusieron en la microplaca negra de 96 pozos. La mezcla se pre incubó durante 15 minutos a 37°C antes de añadir el AAPH (25 μL ; 40 mmol/L de concentración final). La fluorescencia fue registrada cada minuto durante 120 min. Las medidas de fluorescencia se realizaron a 37 C. Los filtros de excitación y emisión fueron de 485 y 520 nm, usando un Varioskam Lux multiplier reader equipment (Thermo Fisher Scientific, USA), respectivamente.

Escalado de la hidrolisis enzimática

Normalmente, el proceso de escalado se basa en el llamado “principio de similitud química, biológica y geométrica”, en el que las diferencias de propiedades entre los dos sistemas mantienen una proporción constante y la reacción se lleva a cabo en las mismas condiciones (Ruiz & Álvarez, 2011). En algunos casos, sólo se utiliza la similitud dinámica, pero en otros es necesario recurrir al análisis dimensional (Cacciuttolo & Arunakumari, 2005; Marko, 2006). La teoría en la que se basa este modelo afirma que “dos procesos pueden considerarse completamente similares si tienen similitud geométrica espacial y si cada uno de los números adimensionales necesarios para describirlos tiene el mismo valor numérico ($\pi_i = \text{idem}$).” Esto se debe a que el espacio Pi es invariante e independiente de la escala a la que se trabaje. “Cada uno de los puntos determinados por una relación Pi corresponderá a un número infinito de formas posibles de realizarse”. El proceso de escalado se realizó pasando de un reactor de 0.5L (modelo de laboratorio) a un reactor de 7.5L (prototipo escala de banco), presentando una relación de escalado de 1:15, como se observa en la Figura 1 (Gómez Grimaldos & Zapata, 2021). La hidrólisis enzimática en el escalado se realizó para ambas escalas bajo las condiciones óptimas definidas en el diseño experimental. Se parte de un modelo geométrico a pequeña escala con algunas

características similares al prototipo y de la comprensión de las propiedades físicas del fluido y del sistema, así como de las dimensiones de los sistemas de trabajo (Sofer, 2003). El análisis dimensional establece que un fenómeno físico puede formularse de forma dimensionalmente homogénea siguiendo los siguientes tres pasos:

1. Hacer una lista de las variables importantes, que incluyen los parámetros físicos de influencia en el sistema modelo, que son independientes entre sí y que deben ser considerados con respecto a la cantidad que se necesita producir.
2. Verificar la homogeneidad dimensional del contenido físico transfiriéndolo a una forma adimensional.
3. Determinar un conjunto de números adimensionales de Pi a partir de una matriz de transformación, procedimiento conocido como “teorema de Pi”, que determina que se necesitan al menos 2 números adimensionales para describir el sistema tecnológico mediante un cálculo matricial (Marko, 2006).

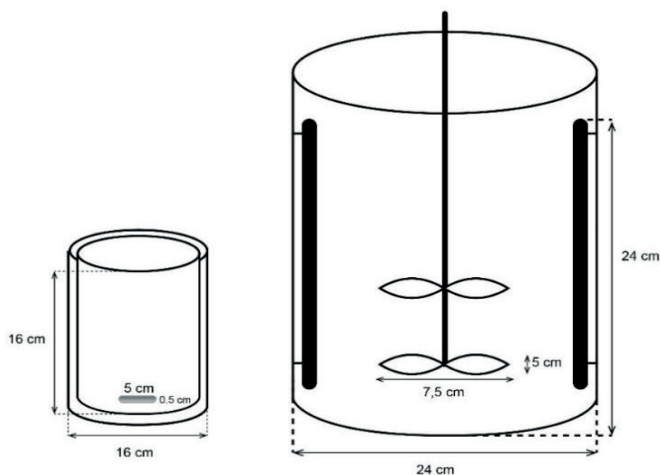


Figura 1. Dimensiones del reactor modelo de 0.5L (izquierda) y reactor prototipo de 7.5L (derecha)

Análisis estadístico

La adecuación del modelo experimental, la significancia estadística de los coeficientes de regresión y la interacción entre las distintas variables independientes fueron evaluadas mediante análisis de varianza (ANOVA). La significancia de los coeficientes estimados en el modelo se probó utilizando el estadístico F (valor-*P*) con un nivel de confianza del 95%. Adicionalmente, las diferencias de medias existentes entre los valores de actividad enzimática de la Alcalasa 2,4L a los diferentes niveles de agitación, y los valores de actividad biológica obtenidas entre el modelo y el prototipo en los ensayos de escalado, se evaluaron mediante la prueba de la mínima diferencia significativa (LSD), usando el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis proximal de los sustratos en estudio

En la tabla 2 se muestra la composición química proximal de las vísceras enteras y desengrasadas, así como de la lombriz roja californiana, que fueron los sustratos usados como modelo en el presente capítulo. Otros autores han señalado resultados similares en cuanto a la composición proximal de vísceras enteras de otras especies (Bhaskar & Mahendrakar, 2008; Šližyte et al., 2005a), sin embargo de las vísceras desengrasadas no han sido suficientemente reportadas.

Composición g/100g	Vísceras enteras	Vísceras desengrasadas	Lombriz roja Californiana
Humedad	62,00	83,21	84,87
Lípidos	26,08	1,88	1,42
Proteína	8,48	10,04	7,86
Genizas	1,19	1,71	2,82

Tabla 2. Composición proximal de las vísceras enteras y desengrasadas

Efecto de Cg y Va sobre el proceso de hidrólisis

En la tabla 1 se muestran las 13 corridas del diseño experimental y los valores de GH obtenido en cada corrida. El diseño experimental fue realizado para evaluar el efecto Va y Cg sobre el GH, en el proceso de hidrólisis de VTR con Alcalasa 2,4 L. Se puede ver que los valores obtenidos después de las 4 horas de reacción están en el rango de 4,9 y 10,6%, los cuales son comparables con los GH obtenidos en el mismo tiempo de reacción por (Abdelhedi et al., 2017) para vísceras de *Mustelus* con diferentes enzimas exógenas. Por otro lado, en la tabla 3 aparece el ANOVA del diseño experimental, el cual contiene la significancia estadística del modelo, de cada factor o interacción (valor-*P*), el R^2 , R^2 -Ajustado y la carencia de ajuste.

Fuente (X_i)	Valor- P
Modelo	0,0006
Va	0,0008
Cg	0,0203
Va ²	0,0032
Carencia de ajuste	0,2732
R^2	0,8437
R^2 Ajustado	0,7917

Tabla 3. Análisis de varianza (Valor- P) del diseño factorial

El ANOVA del diseño experimental presenta el valor P para el modelo y los factores, y fue verificado con los supuestos de normalidad, varianza constante e independencia. Los resultados muestran un modelo altamente significativo, donde Va es el factor con mayor influencia sobre la variable respuesta, presentando significancia tanto de su término lineal y cuadrático. Mientras que Cg tiene un efecto menor en su término lineal, con un valor P de 0,01. En el rango experimental de trabajo, el término cuadráticos de Cg y la interacción entre las dos variables, no presentan efectos significativos sobre la variable de respuesta con valores $p > 0,05$, por lo que no fueron tenidas en cuenta para la definición del modelo polinomial, por considerar que es poca su contribución a la explicación de la respuesta. Dicho modelo se presenta en la ecuación 5 en cual se describe el GH en función a Va y Cg.

$$GH = 3,528 + (1,811xVa) - (0,062xCg) - (0,115xVa^2) \quad (5)$$

La figura 2 presenta el comportamiento gráfico del GH en relación con los dos factores Va y Cg. De acuerdo con el modelo ajustado, se observa que Va tiene un impacto más significativo que Cg. Se puede ver que el efecto de Va en su término lineal es positivo sobre el GH, mientras que en su término cuadrático es negativo. Esto sugiere que bajas valores de Va favorecen la reacción, probablemente porque contribuye a mantener una mayor homogeneidad en la muestra. Sin embargo, cuando Va supera cierto umbral, comienza a tener un efecto negativo sobre el GH, lo que se refleja en un cambio en la pendiente del gráfico. Este fenómeno podría explicarse por un cambio conformacional de la Alcalasa 2,4L debido a la alta velocidad de agitación, lo que dificulta la interacción enzima-sustrato, o por un proceso de inactivación y agregación de la enzima. Algunos autores han informado sobre este último fenómeno, mostrando que parámetros hidrodinámicos como la agitación mecánica pueden provocar la inactivación enzimática al aumentar la velocidad de agitación (Caussette et al., 1997b; Colombié et al., 2001b; Glatz et al., n.d.). En relación a la Cg, la figura 2 muestra un efecto negativo sobre el GH de la reacción, sugiriendo que la grasa interfiere en la hidrólisis de proteínas. Este fenómeno ha sido poco estudiado, pero algunos investigadores lo atribuyen a la formación de complejos proteína-lípido, los cuales son más resistentes a la acción catalítica de las proteasas (Šližyte et al., 2005b).

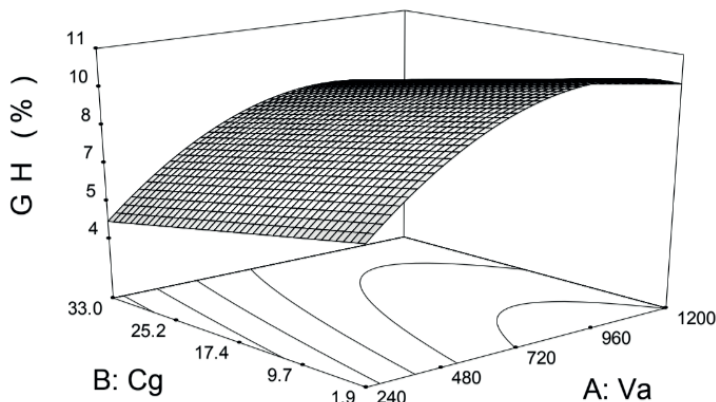


Figura 2. Gráfico de superficie de respuesta para el efecto de Va y Cg sobre el GH de la reacción.

La optimización del modelo de la ecuación 5 predijo los valores de Va y Cg que maximizan el GH. Para corroborar la validez del modelo, se realizaron ensayos experimentales en las condiciones óptimas y los resultados predichos y experimentales se muestran en la tabla 4. Encontrándose un error relativo del 4.9%, lo cual indica la capacidad del modelo para predecir el comportamiento del GH en función de Va y Cg.

Factor	Valor óptimo	Tiempo predicho	Tiempo experimental	Error relativo
Va (rpm)	982	10,00	9,51 ± 0,02	4,9 %
Cg (% p/p)	2,0			

Tabla 4. Máximos locales predichos y experimentales en la optimización de Va y Cg para la hidrólisis enzimática de VTR

Inactivación de la Alcalasa 2,4L por efecto de la agitación

La figura 3 muestra el comportamiento de la actividad catalítica de la enzima en agua, en ausencia del sustrato a pH 9,5 y 53 °C, en función de la velocidad de agitación. En esta figura se observa como la actividad descende con el tiempo, para todas las velocidades evaluadas. Sin embargo, durante los primeros 200 min, no observan diferencias en la actividad enzimática para las diferentes velocidades evaluadas, lo cual señala que el descenso en la actividad de la enzima se debe al efecto factores diferentes a la agitación mecánica, como pueden ser el pH y la temperatura (England et al., 2014; Lassé et al., 2015; Perdana et al., 2012; Verhaeghe et al., 2016).

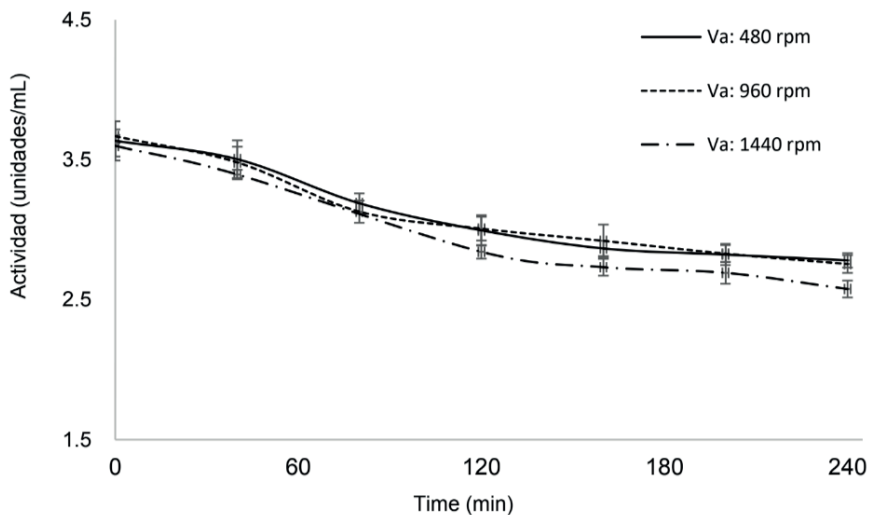


Figura 3. Cinética de inactivación de la Alcalasa 2,4L bajo diferentes niveles de agitación

Por encima de los 200 min, la velocidad de agitación de 1440 rpm provoca un descenso significativamente mayor respecto a las otras dos. Señalando que someter la enzima a altas velocidades de agitación, por periodos de tiempo prolongados, pueden acabar por afectar la actividad catalítica de la enzima, posiblemente quizás por efecto de interfases físicas y catalizada por el incremento de superficies con propiedades hidrofóbicas de las enzimas inactivadas, como lo propuso Colombié et al. (2001). Debido a que el efecto de V_a en presencia del sustrato sobre la actividad catalítica de la enzima, que se observó en el diseño experimental, no puede ser explicado por agregación de la enzima o inactivación de esta, se diseñaron experimentos para determinar si el incremento en V_a afectaba negativamente la actividad de la enzima, posiblemente porque se modificó la interacción enzima-sustrato. En la figura 4 se presentan los resultados de dichos experimentos, en ella se observa que la actividad de la enzima se incrementa con la velocidad de agitación hasta llegar a 960 rpm, por encima de lo cual se observa un descenso en la actividad, corroborando lo que se había observado en el diseño experimental inicial. Este comportamiento puede explicarse considerando que inicialmente el incremento de V_a favorece la homogeneidad del medio de reacción, con lo que se facilita la interacción enzima-sustrato, pero al superar cierto umbral, mayores valores de V_a pueden generar modificaciones que afecten de forma negativa la actividad de la enzima.

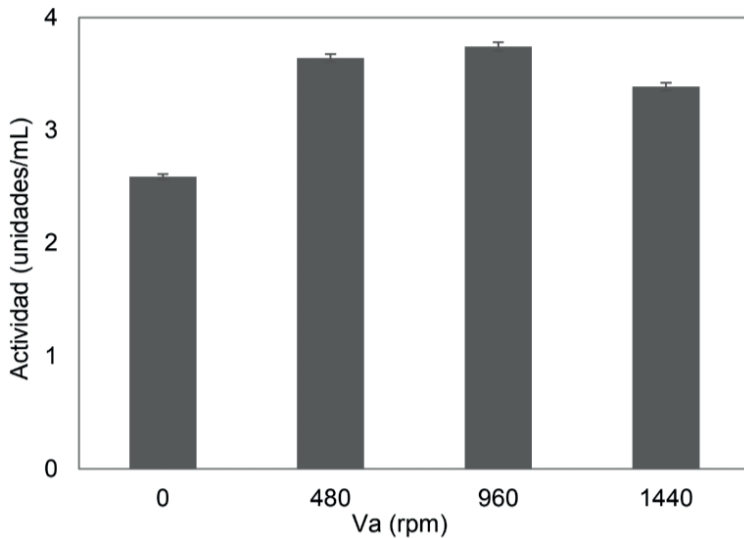


Figura 4. Actividad catalítica de la alcalasa 2,4 L a diferentes velocidades de agitación.

Análisis de mecanismo de inhibición de la grasa sobre la enzima Alcalasa 2,4L

El contenido de grasa genera un descenso en la actividad enzimática, como ya fue demostrado en el diseño experimental. Para corroborar si se trata de un efecto inhibitorio sobre la Alcalasa 2,4L y evaluar mecanismo por el cual se pueda estar dando dicha inhibición, se ajustaron gráficos de Lineweaver–Burk (figura 4), con diferentes niveles de grasa (inhibidor). A partir de los cuales se determinó que la grasa sigue un mecanismo de inhibitorio competitivo sobre la Alcalasa 2,4 L y que concentraciones por encima del 1,9% no provocan aumento significativo de dicha inhibición. Este mecanismo de inhibición se explica debido a que la Alcalasa 2,4L está constituida mayoritariamente por subtilisina, una seri-proteasa que cataliza no solo la hidrólisis de amidas, sino también de esteres (Wong, 1995); considerando el elevado contenido de enlaces éster en la grasa (Belitz et al., 2009), existe la posibilidad de que dichos componentes compitan por el sitio activo de la enzima con el sustrato proteico, generando de ese modo una disminución del grado de hidrólisis de la proteína.

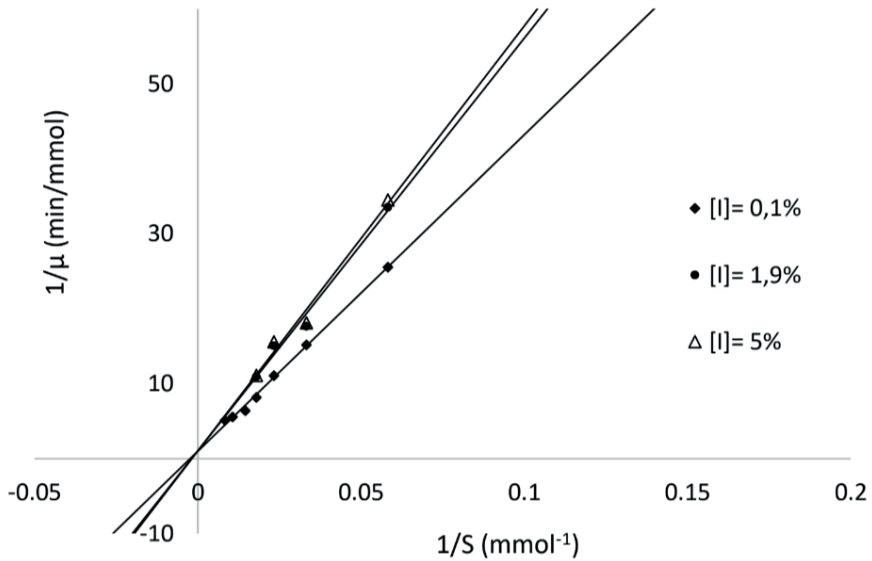


Figura 5. Grafico de Lineweaver–Burk para la velocidad de reacción de la Alcalasa 2,4L en presencia de grasa.

Escalado del proceso de hidrólisis enzimática de proteínas de lombriz roja californiana

Asumiendo la similitud dinámica como criterio de escalado, se aplicó un análisis dimensional, en el que se tomó como variables influyentes en el proceso de la hidrólisis enzimática el diámetro del reactor (D_r) y el diámetro del agitador (D_s), desde el punto de vista geométrico. Se tomaron como propiedades físicas del fluido la densidad (ρ), la viscosidad cinemática (ν), la concentración del sustrato (S_0) y como parámetros dinámicos la velocidad del agitador (N_i) y el tiempo de reacción (t). En este sentido, la lista de relevancia quedó establecida como: S_0 , D_s , D_r , ρ , ν , N_i y t . Además, las dimensiones involucradas en las variables de influencia son M, L y t las cuales mediante la ecuación 6, permiten calcular el rango de la matriz dimensional.

$$\text{Rango matriz} = \text{Parámetros-dimensiones} = 7 - 3 = 4 \quad (6)$$

Con base en el resultado anterior, se define la necesidad de un total de cuatro (4) números Π adimensionales. De la transformación de la lista de relevancia en una matriz dimensional con las cantidades físicas, la solución matricial condujo a una matriz reducida (Figura 6), que resultó en los cuatro números Π adimensionales presentados en las ecuaciones 7-10. Estos números, adecuadamente combinados, dan como resultado el número Π observado en la ecuación 11, donde se identifica que el número adimensional que gobierna el proceso de escalamiento de la hidrólisis enzimática es el número de Reynolds (Banerjee et al., 2012; Palmqvist et al., 2016).

$$\begin{bmatrix} & S_o & t & D_{ag} & D_r & \rho & \mu & N_i \\ M & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 1 & 0 \\ L & 0 & 0 & 1 & 1 & -3 & -1 & 0 \\ & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & -1 & -1 \end{bmatrix}$$

Figura 6. Matriz de reducción dimensional.

$$\pi_1 = \frac{D_{ag}}{D_r} \quad (7)$$

$$\pi_2 = \frac{\rho * D_{ag}^3}{S_o} \quad (8)$$

$$\pi_3 = N_i * t \quad (9)$$

$$\pi_4 = \frac{D_r * t * \mu}{S_o} \quad (10)$$

El número de Reynolds (Re) está relacionado con las condiciones dinámicas del recipiente de reacción. Por lo tanto, el dimensionamiento se realizó manteniendo su similitud dinámica, conservando así constante el número Re entre el sistema de laboratorio y el prototipo. Según lo establecido por el procedimiento de análisis dimensional en el proceso de escalado, se tuvieron en cuenta las relaciones paramétricas de seis dimensiones (Cacciuttolo & Arunakumari, 2005; Gómez Grimaldos & Zapata, 2021).

$$\frac{\frac{N_i * t * \rho * D_{ag}^3}{S_o}}{\frac{D_r * t * \mu * D_{ag}}{D_r}} = \frac{\rho * N_i * D_{ag}^2}{\mu} = \text{Reynolds} \quad (11)$$

En consecuencia, la relación mostrada por el número Pi será válida para los dos sistemas de estudio, con un aumento de escala en el llamado punto de operación. Este procedimiento se utilizó desde que se conoció el sistema prototipo. Por supuesto, el concepto de similitud no garantiza que un proceso será igual en el modelo y en la versión a escala en todos los aspectos, ya que este método sólo reproduce el mismo proceso en las condiciones analizadas, y aquellas que fueron descritas por una determinada relación Pi. Ambos sistemas de reacción fueron homogéneos y mantuvieron una similitud dinámica, lo cual es un requisito para escalar cualquier bioproceso (Figura 1). El aumento de escala basado en la similitud dinámica del sistema utilizando el número de Reynolds supone que las fuerzas de inercia con respecto a las tensiones viscosas permanecen constantes en ambas escalas. En este estudio se ha utilizado el criterio del número de Reynolds constante que, por su carácter teórico y empírico, determina una similitud en el patrón

de flujo hidrodinámico. Esto implica que el proceso debe mantener el mismo grado de homogeneidad en ambos sistemas (Gómez Grimaldos & Zapata, 2021; Junker, 2004). Con el aumento de la escala, la velocidad de agitación necesaria para mantener constante el Reynolds disminuye significativamente, con el objetivo de conseguir un comportamiento hidrodinámico similar en ambos procesos (Ruiz & Álvarez, 2011). La condición para lograr la similitud hidrodinámica se establece en la ecuación 12, donde “m” corresponde al modelo y “p” corresponde al prototipo; N_i es la velocidad de agitación (rpm) y D_s es el diámetro del agitador (m). En este caso la densidad y viscosidad del medio son constantes en ambos sistemas y la única variación es en el diámetro de los agitadores. En este sentido, la velocidad del agitador prototipo de $(N_i)_p$ varía en función del tamaño del sistema de reacción, como se muestra en la ecuación 12.

$$(N_i \cdot D_{ag}^2)_m = (N_i \cdot D_{ag}^2)_p \rightarrow (N_i)_p = \frac{(N_i \cdot D_{ag}^2)_m}{(D_{ag}^2)_p} \quad (12)$$

El diámetro del agitador del reactor de 7,5L fue de 0,075 m y el diámetro respectivo de la barra agitadora en el sistema de reacción de 0,5 L fue de 0,05 m, presentando una relación de escalado similar a las reportadas en la literatura para procesos de hidrólisis de proteínas (Martínez et al., 2017). Las condiciones establecidas para la hidrólisis enzimática en el reactor de 7,5 L se muestran en la tabla 5, manteniendo constantes los factores de temperatura y pH y ajustando la concentración de sustrato y enzima según el volumen total del reactor. La velocidad del agitador en el prototipo se calculó con la ecuación 12, presentando una reducción respecto al modelo de aproximadamente un 50%. La Figura 7 muestra el comportamiento cinético de la hidrólisis enzimática bajo las condiciones óptimas del diseño experimental, tanto en el reactor de 0,5L como en el de 7,5L. Se encontró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre las propiedades de los hidrolizados en la etapa final del proceso (4000 s).

FACTOR	UNIDADES	Valor
pH		8,50
Temperatura	°C	45
Sustrato	g	1501,05
Enzima	mL	14,93
Agitación	RPM	122,45

Tabla 5. Factores dimensionados para reactor de 7,5L

El análisis cinético de la reacción de hidrólisis enzimática de la proteasa Alcalase® 2,4 L con proteína de lombriz roja californiana dio como resultado un grado final de hidrólisis (GH) de 18,4 %, como se puede observar en la Figura 7, tanto para el reactor de 0,5L como para el reactor de 7,5L. Aproximadamente 40 minutos después de iniciada la hidrólisis (o después 2500 segundos), la curva de hidrólisis enzimática comienza a exhibir un comportamiento asintótico, indicando cambios decrecientes en la velocidad de hidrólisis a medida que avanza el tiempo.

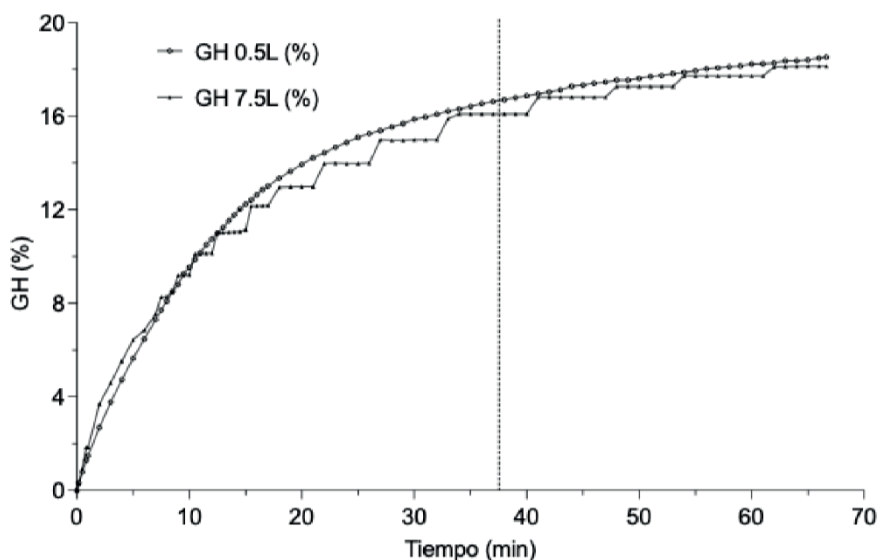


Figura 7. Grado de hidrólisis del modelo (0,5L) y el prototipo (7,5L).

En consecuencia, el tiempo máximo de hidrólisis se estableció en 4000 segundos. Esta desaceleración en la hidrólisis enzimática se puede atribuir principalmente a tres factores críticos: (1) una disminución gradual en la disponibilidad de enlaces peptídicos que son susceptibles a las enzimas proteolíticas, que ocurre naturalmente a medida que el sustrato se hidroliza cada vez más; (b) la acumulación de productos de hidrólisis que pueden actuar como inhibidores, reduciendo así la eficacia de la enzima; y (c) la desnaturalización térmica de la enzima, un proceso en el que la estructura de la enzima se altera debido a la exposición prolongada a la temperatura operativa, lo que lleva a una pérdida de actividad catalítica (Gómez et al., 2013). Este valor de GH sugiere que el producto de reacción tiene un potencial prometedor como hidrolizado con componentes de interés biológico, ya que se ha demostrado que valores de GH superiores al 10% tienden a generar hidrolizados con propiedades bioactivas (Benítez et al., 2008a). Estos hidrolizados son potencialmente valiosos en diversas aplicaciones, desde nutracéuticos hasta ingredientes alimentarios funcionales, debido a su capacidad para ejercer efectos beneficiosos para la salud. Estos

efectos pueden incluir actividades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias, entre otras. En la tabla 6 se observa la verificación de las actividades antioxidantes en los dos sistemas de reacción. Esto valida y confirma que el proceso de ampliación de escala de la hidrólisis enzimática de la proteína de la lombriz roja californiana se llevó a cabo adecuadamente, y que los números de Pi adimensionales encontrados, y el número de Reynolds constante son criterios válidos para la ampliación de escala de este tipo de proceso. Esto es relevante, considerando las diferencias geométricas entre el modelo y el prototipo, ya que el modelo utiliza una barra magnética de agitación en un reactor sin deflectores, mientras que el prototipo utiliza un reactor con dos deflectores y dos turbinas Rushton. Resultados similares fueron reportados por Gómez Grimaldos & Zapata, (2021), en el aumento de la hidrólisis enzimática de la proteína plasmática bovina para producir un antioxidante a partir de una fuente biológica, escalando desde un reactor de 1L a uno de 5L. Adicionalmente, Pozdnyakov et al. (2022), informaron que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos en la cinética de hidrólisis enzimática del aislado de proteína de soja entre la escala de laboratorio y una escala semiindustrial.

Muestra	GH	Proteína	TEAC	FRAP	ORAC
	%	%	μ eqmol Trolox /g prot	μ eqmol Trolox /g prot	μ eqmol Trolox /g prot
Reactor 0,5 L	18,552	3,27 ^a	2088,82 ^a	183,12 ^a	858,72 ^a
Reactor 7,5 L	18,202	3,15 ^a	2055,08 ^b	170,09 ^a	823,79 ^a

Tabla 6. Verificación del escalado de la hidrólisis enzimática

CONCLUSIONES

La velocidad de agitación y el contenido de grasa del sistema de reacción afectan significativamente el grado de hidrólisis alcanzado en la reacción de hidrólisis enzimática de VTR, llegando a un máximo de 9,5% de GH, trabajando a V_a de 982 rpm y C_g de 2,0%. La grasa presente en las vísceras de tilapia roja (*Oreochromis sp.*), sigue un mecanismo de inhibición competitiva sobre la Alcalasa 2,4L, mientras que V_a reduce la actividad catalítica de la enzima, cuando se trabaja a valores de mayores a los 960 rpm.

El escalado del sistema de reacción desde un reactor de 0.5L hasta uno de 7.5L utilizando el criterio de similitud dinámica basado en el número de Reynolds, permite reproducir las condiciones óptimas obtenidas en el sistema modelo, lo que es esencial para lograr su validación a nivel piloto o industrial. El hidrolizado enzimático de lombriz roja californiana presenta valores elevados de actividad antioxidante evaluada por diferentes metodologías en comparación con hidrolizados de proteínas de otras fuentes animales, lo que constituye un valor importante para su implementación en alimentos funcionales o nutracéuticos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores del presente trabajo dan las gracias a la Gobernación de Antioquia, al Sistema General de Regalías de Colombia y a la estrategia de sostenibilidad 2014-2015 del Comité para el Desarrollo de la Investigación en la Universidad de Antioquia (CODI), por el apoyo financiero entregado.

REFERENCIAS

- Abdelhedi, O., Nasri, R., Jridi, M., Mora, L., Oseguera-Toledo, M. E., Aristoy, M. C., Amara, I. Ben, Toldrá, F., & Nasri, M. (2017). In silico analysis and antihypertensive effect of ACE-inhibitory peptides from smooth-hound viscera protein hydrolysate: Enzyme-peptide interaction study using molecular docking simulation. *Process Biochemistry*, 58(December 2016), 145–159. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.04.032>
- Adler-Nissen, J. (1985). Enzymic hydrolysis of food protein. *Elsevier Applied Science Publishers*.
- AOAC. (2005). *Official Methods of Analysis* (sixteenth). Association of Official Analytical Chemists.
- Banerjee, G., Car, S., Liu, T., Williams, D. L., Meza, S. L., Walton, J. D., & Hodge, D. B. (2012). Scale-up and integration of alkaline hydrogen peroxide pretreatment, enzymatic hydrolysis, and ethanolic fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(4), 922–931. <https://doi.org/10.1002/bit.24385>
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (Springer-Verlag, Ed.; 4th ed.). <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008a). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. *Acta Bioquím Clin Latinoam*, 42(2), 227–236. <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008b). Hidrolizados de proteína : procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–237.
- Benzie, I., & Straint, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhaskar, N., & Mahendrakar, N. S. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (Catla catla): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource Technology*, 99(10), 4105–4111. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.006>
- Cacciuttolo, M., & Arunakumari, A. (2005). *Scale-Up Considerations for Biotechnology-Derived Products* (Inc. Marcel Dekker, Ed.). <https://doi.org/10.1201/9781420026658.ch5>
- Caussette, M., Planche, H., Delepine, S., Monsan, P., Gaunand, a, & Lindet, B. (1997a). The self catalytic enzyme inactivation induced by solvent stirring: a new example of protein conformational change induction. *Protein Engineering*, 10(10), 1235–1240. <https://doi.org/10.1093/protein/10.10.1235>
- Caussette, M., Planche, H., Delepine, S., Monsan, P., Gaunand, A., & Lindet, B. (1997b). The self catalytic enzyme inactivation induced by solvent stirring: a new example of protein conformational change induction. In *Protein Engineering* (Vol. 10, Issue 10).

- Charm, S., & Wong, B. (1981). Shear effects on enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*, 3(2), 111–118. [https://doi.org/doi:10.1016/0141-0229\(81\)90068-5](https://doi.org/doi:10.1016/0141-0229(81)90068-5)
- Cheung, I. W. Y., Cheung, L. K. Y., Tan, N. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2012). The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. *Food Chemistry*, 134(3), 1297–1306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.215>
- Colombié, S., Gaunand, A., & Lindet, B. (2001a). Lysozyme inactivation under mechanical stirring: Effect of physical and molecular interfaces. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9–10), 820–826. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00340-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00340-4)
- Colombié, S., Gaunand, A., & Lindet, B. (2001b). *Lysozyme inactivation under mechanical stirring: effect of physical and molecular interfaces*. www.elsevier.com/locate/enzmictec
- England, E. M., Matarneh, S. K., Scheffler, T. L., Wachet, C., & Gerrard, D. E. (2014). pH inactivation of phosphofructokinase arrests postmortem glycolysis. *Meat Science*, 98(4), 850–857. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.019>
- Forghani, B., Ebrahimpour, A., Bakar, J., Abdul Hamid, A., Hassan, Z., & Saari, N. (2012). Enzyme hydrolysates from *Stichopus horrens* as a new source for angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/236384>
- Gaviria, Y. S., & Zapata, J. E. (2023). Efecto del fraccionamiento con membranas sobre la actividad biológica de hidrolizados enzimáticos de proteína de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). *Información Tecnológica*, 34(2), 147–158. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642023000200147>
- Gianfranceschi, G. L., Gianfranceschi, G., Quassinti, L., & Bramucci, M. (2018). Biochemical requirements of bioactive peptides for nutraceutical efficacy. *Journal of Functional Foods*, 47, 252–263. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.034>
- Glatz, C. E., Hoare, M., & Landa-Vertiz, J. (n.d.). *The Formation and Growth of Protein Precipitates in a Continuous Stirred-Tank*.
- Gómez Grimaldos, N., & Zapata, J. E. ; (2021). Scaling up the enzymatic hydrolysis of bovine plasma protein to produce an 3 antioxidant from a biological source. *Curr Pharm Biotechnol.*, 22(15), 150–158. <https://doi.org/DOL: 10.2174/1389201021666200807104636>
- 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. *Informacion Tecnologica*, 24(1), 33–42. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000100005>
- 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(7), 883. <https://doi.org/10.3390/foods9070883>
- Guadix, A. ;, Guadix, E. M. ;, Páez-Dueñas, M. P. ;, González-Tello, P. Y., & Camacho, F. (2000). *Technological processes and methods of control in the hydrolysis of proteins* (Vol. 41, Issue 1).

Habinshuti, I., Nsengumuremyi, D., Muhoza, B., Ebenezer, F., Yinka Aregbe, A., & Antoine Ndisanze, M. (2023). Recent and novel processing technologies coupled with enzymatic hydrolysis to enhance the production of antioxidant peptides from food proteins: A review. *Food Chemistry*, *423*, 136313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136313>

Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, *51*, 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.007>

Junker, B. H. (2004). Scale-Up Methodologies for Escherichia coli and Yeast Fermentation Processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *97*(6), 347–364. <https://doi.org/10.1263/jbb.97.347>

Kafle, B., Måge, I., Wubshet, S. G., Dankel, K., Cattaldo, M., Böcker, U., O'Farrell, M., & Afseth, N. K. (2024). From laboratory to industrial use: Understanding process variation during enzymatic protein hydrolysis with dry film fourier-transform infrared spectroscopy. *Food Control*, *164*, 110577. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2024.110577>

Lassé, M., Deb-Choudhury, S., Haines, S., Larsen, N., Gerrard, J. a., & Dyer, J. M. (2015). The impact of pH, salt concentration and heat on digestibility and amino acid modification in egg white protein. *Journal of Food Composition and Analysis*, *38*, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.08.007>

Marko, Z. (2006). *Scale-up in chemical engineering: second, completely revised and extended edition*. (Wiley-VCH verlag GmbH & Co., Ed.; 2nd ed.).

Martínez, D., Menéndez, C., Hernández, L., Sobrino, A., Trujillo, L. E., Rodríguez, I., & Pérez, E. R. (2017). Scaling-up batch conditions for efficient sucrose hydrolysis catalyzed by an immobilized recombinant *Pichia pastoris* cells in a stirrer tank reactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, *25*, 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.11.003>

Ou, B., Maureen, H.-W., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.*, *49*(295–6615), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf1010586o>

Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, *115*(1), 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013>

Palmqvist, B., Kadić, A., Hägglund, K., Petersson, A., & Lidén, G. (2016). Scale-up of high-solid enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood: the effects of reactor flow conditions. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *6*(2), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s13399-015-0177-3>

Perdana, J., Fox, M. B., Schutyser, M. A. I., & Boom, R. M. (2012). Enzyme inactivation kinetics: Coupled effects of temperature and moisture content. *Food Chemistry*, *133*(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.080>

Pozdnyakov, N., Shilov, S., Lukin, A., Bolshakov, M., & Sogorin, E. (2022). Investigation of enzymatic hydrolysis kinetics of soy protein isolate: laboratory and semi-industrial scale. *Bioresources and Bioprocessing*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00518-2>

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*(9/10), 1231–1237. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Ruiz, Á. A., & Álvarez, H. (2011). Escalamiento de procesos químicos y bioquímicos basado en un modelo fenomenológico. *Informacion Tecnologica*, 22(6), 33–52. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642011000600005>

Seo, H.-W., Jung, E.-Y., Go, G., Kim, G.-D., Joo, S.-T., & Yang, H.-S. (2015). Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 185(2015), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.133>

Singh, N., & Gaur, S. (2024). New insights into multifunctional aspects of milk derived bioactive peptides: A review. *Food Chemistry Advances*, 4, 100628. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2024.100628>

Šližyte, R., Daukšas, E., Falch, E., Storror, I., & Rustad, T. (2005a). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(6), 2021–2033. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.016>

Šližyte, R., Daukšas, E., Falch, E., Storror, I., & Rustad, T. (2005b). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(6), 2021–2033. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.016>

Sofer, G. (2003). Validation of biotechnology processes. In *Pharmaceutical Process Validation: An International, An International Third Edition, Revised and Expanded*. <https://doi.org/10.1201/9780203912119-11>

Trusek-Holownia, A., Lech, M., & Noworyta, A. (2016). Protein enzymatic hydrolysis integrated with ultrafiltration: Thermolysin application in obtaining peptides. *Chemical Engineering Journal*, 305, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.087>

Tu, M., Cheng, S., Lu, W., & Du, M. (2018). Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 7–17. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.005>

Verhaeghe, T., Vlaemynck, G., De Block, J., Van Weyenberg, S., & Hendrickx, M. (2016). Thermal inactivation kinetics of proteases and polyphenoloxidase in brown shrimp (*Crangon crangon*). *Food Chemistry*, 197, 641–647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.024>

Wong, D. W. S. (1995). *Food Enzymes: Structure and Mechanism* (1st ed.). Springer Science & Business Media. <https://doi.org/DOI 10.1007/978-1-4757-2349-6>

Zapata Montoya, J. E., Giraldo-Rios, D. E., & Baéz-Suarez, A. J. (2018). Kinetic modeling of the enzymatic hydrolysis of proteins of viscera from red tilapia (*Oreochromis sp.*): Effect of substrate and enzyme concentration. *Vitae*, 25(1), 17–25. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v25n1a03>