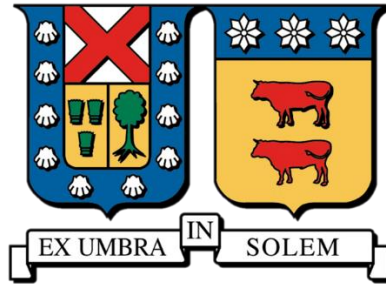


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO, CHILE



**ESTUDIO DEL EFECTO DEL TIPO DE PRETRATAMIENTO
SOBRE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNA DE
CHAMPIÑÓN OSTRA (PLEUROTUS OSTREATUS)**

RODRIGO IGNACIO CRUZ VEGA

Memoria para optar al título de
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

Profesor Guía

Dr. Pedro Valencia Araya

Profesor Co-Guía

Dr. Sergio Almonacid

Marzo 2024

Agradecimientos

Ahora que llega el fin de esta época universitaria, después de tantos años dedicados con un esfuerzo continuo durante todo este proceso, me gustaría aprovechar este momento para dar agradecimientos a todas las personas que han sido parte de este proceso.

Primero, me gustaría dar un agradecimiento a mi madre Cecilia Vega, ya que, sin su constante apoyo no estoy seguro acerca de si hubiera podido llegar al fin de esta carrera universitaria, sus pláticas, ánimos, abrazos y cariño me ayudaron en gran medida a ser la persona que soy hoy en día y me siento completamente orgulloso de ser su hijo.

Segundo, también me gustaría agradecer a mi padre Benito Cruz, una parte importante de mi familia, que, aunque no haya tenido todo el tiempo para acompañarlo en sus locuras, su preocupación por mí sumaba todos los días me ayudaba a pensar que el día comenzaba de buena manera siempre, una persona que siempre era capaz de conseguirme una sonrisa y que lo amo del fondo de mi corazón.

También, me gustaría dar gracias a todos los integrantes de mi hogar como mi familia cercana, ya que, no podría haber elegido un ambiente más favorable para mi desarrollo como persona, buscando siempre el lado positivo de las cosas. Muchas gracias, Carolina, Mimi, Daniel, Diego, Claudia, Poli.

Asimismo, este largo proceso habría sido imposible sin los amigos que fui realizando durante mi vida universitaria como también aquellos que ya eran parte de mi vida previo a este proceso. El pasar del tiempo fue mucho más ameno gracias a su presencia, y la liberación de estrés era inmediata en su presencia, las bromas volaban, aunque no ocurrieran cosas significativas en el día a día. Muchas gracias por su amistad, Julio, Manuel, Catalina, Martín, Vicente, Ignacio, Ignacia, Camila, Branka, Catalina y Camille.

Por último, me gustaría dar un profundo gracias a todos los profesores y profesoras que me ayudaron en mi formación profesional. Especialmente a mi profesor de memoria, Pedro Valencia, como también a todo el personal propia del laboratorio de catálisis, que fueron un apoyo tanto a nivel técnico como personal para sobrellevar los turnos del laboratorio.

1. Resumen Ejecutivo

Con el aumento de la población en el mundo, cada vez es mayor la necesidad de evaluar la producción de alimentos altos en macronutrientes que requieran menos recursos para su producción. En este trabajo, se estudió la implementación de alimentos de origen fúngico como una opción en un futuro, debido a sus ventajas respecto a alimentos proteicos de origen animal y vegetal. Para esto, se utilizó la hidrólisis enzimática de proteínas, siendo este un método biológico de extracción de proteínas que, mediante el uso de enzimas solubiliza las proteínas para realizar la separación del contenido proteico efectivamente.

Como objetivo, se busco evaluar el efecto del tipo de pretratamiento sobre la eficiencia de la hidrólisis de proteína de champiñón ostra.

Igualmente, el enfoque del estudio se centró en el comportamiento de la reacción de hidrólisis, extracción de nitrógeno y un análisis económico sobre el producto final, teniendo como público objetivo deportistas de alto-medio rendimiento y personas que quieran seguir un monitoreo continuo tanto de sus macronutrientes como micronutrientes ingeridos. Considerando que los pretratamiento seleccionados son el uso de escaldado, secado y secado más adición de celulasa.

Metodológicamente, se propuso estudiar el efecto de la dosis de proteasa y el pretratamiento aplicado, sobre el comportamiento de la reacción, la concentración de grupos α -amino y la extracción de nitrógeno. Estas hidrólisis enzimáticas se realizaron a 55 [°C], en agitación continua, pH nativo sin control, con una proporción sustrato/mezcla de un 50% en el interior del recipiente, durante un periodo de 60 minutos. Donde, las concentraciones de proteasas añadidas en los experimentos respectivos son igual a 0,42 [mAU/g_{champ}]; 0,84 [mAU/g_{champ}] y 1,68 [mAU/g_{champ}], agregando una concentración de celulasa de 76,72 [FPU/g_{quitina}] en su pretratamiento específico.

Así, se tuvo que los pretratamientos de secado y secado más celulasa fueron más eficientes respecto a utilizar escaldado como pretratamiento. La diferencia entre estos es que, al realizar el escaldado, se pierde cierta cantidad de proteína en medio del pretratamiento, además de inactivar la mayoría de las enzimas presentes en el alimento, terminando así en un menor grado de hidrólisis, concentración de grupos α -amino y recuperación de nitrógeno. Por otro lado, el uso de secado como pretratamiento fue clave para maximizar la recuperación de nitrógeno presente inicialmente en el sustrato. Además, cuando se estudiaron los costos requeridos para la producción comercial de este hidrolizado, se observó que el costo mínimo requerido era aproximadamente de 62 [USD] para producir 1 kilo de proteína en base de *Pleurotus Ostreatus*, esto al utilizar secado como pretratamiento, siendo el factor más costoso la cultivación misma del hongo.

En conclusión, al comparar los pretratamiento usados, el secado es clave para maximizar la extracción de proteínas, esto sin adición de proteasa o celulasa al realizar la hidrólisis enzimática, debido al nulo efecto presente al agregar estas enzimas. Ahora, respecto a la posibilidad de producir este producto en masa, actualmente no existe posibilidad de llevarse a cabo, debido a los altos costos de cultivo del hongo. Aunque, se recomienda el ahondar la investigación sobre desechos de origen fúngico producidos en otros procesos industriales, ahorrando así los elevados costos de cultivación.

Índice

Agradecimientos	2
1. Resumen Ejecutivo	3
2. Introducción	9
3. Objetivos y alcances	11
3.1 Objetivo General.....	11
3.2 Objetivos Específicos	11
3.3 Alcances.....	11
4. Antecedentes generales	12
4.1 Pleurotus ostreatus.....	12
4.2 Hidrolisis de proteína	13
4.2.1 Hidrolisis Química.....	13
4.2.2 Hidrolisis Enzimática.....	14
4.3 Caracterización de la hidrolisis enzimática	16
4.3.1 Técnicas Analíticas.....	16
4.3.2 Métodos de Caracterización	18
4.4 Pretratamiento	21
4.4.1 Escaldado.....	22
4.4.2 Secado	22
4.4.3 Adición de Celulasa más Secado	22
4.4.4 Liofilización	22
4.5 Hidrolizados proteicos de Hongos	23
5. Metodología.....	24
5.1 Diseño de Experimentos.....	24
5.2 Materia Prima y Reactivos	25
5.2.1 Sustrato	25
5.2.2 Enzima	26
5.3 Pretratamientos	28
5.3.1 Escaldado.....	28
5.3.2 Secado	29
5.3.3 Secado más Adición de Celulasa	30
5.4 Hidrolisis Enzimática.....	31
5.4.1 Fase Soluble.....	33

5.4.2	Recuperación de Nitrógeno	33
5.5	Cuantificación grupos α -amino	34
5.5.1	Grado de Hidrolisis	36
5.5.2	Parámetros Empíricos Asociados a la hidrolisis enzimática	37
5.5.3	Costes Asociados	39
5.5.4	Prueba de Diferencias Significativas.....	41
6.	Resultados y Discusión.....	43
6.1	Caracterización del Hidrolizado	43
6.1.1	Fase Soluble.....	43
6.1.2	Recuperación de Nitrógeno	44
6.1.3	Grado de Hidrolisis	45
6.2	Curvas de grupos α -amino y parámetros del modelo logarítmico	46
6.2.1	Cuantificación de grupos α -amino en la hidrolisis enzimática	46
6.2.2	Parametros del modelo logaritmico.....	49
6.3	Costes Asociados en Producción del Hidrolizado Procesado	50
7.	Conclusiones	52
8.	Referencias.....	53
9.	Anexos.....	57
9.1	Anexo A: Procedimiento método Kjeldahl.....	57
9.2	Anexo B: Calculo Dosis de Proteasa Adicionada.....	58
9.3	Anexo C: Calculo Dosis de Celulasa Adicionada	59
9.4	Anexo D: Elaboración Reactivo OPA.....	59
9.5	Anexo E: Procedimiento Curva de Serina.....	60
9.6	Anexo F: Prueba de Significancia	62
9.7	Anexo G: Test de Anova.....	63
9.8	Anexo H: Test de Tukey.	64

Índice de Figuras

Figura 1. Procedimiento general de hidrólisis enzimática de proteínas (Liceaga & Hall, 2018).	16
Figura 2. Reacción de método OPA Original.....	17
Figura 3. Reacción de método TNBS.....	17
Figura 4. Simulación del grado de conversión (X) vs tiempo adimensional, utilizando un modelo cinético (KM), considerando inhibición por producto (PI) e inactivación enzimática (EI) (Valencia et al., 2014).....	19
Figura 5. Transcurso de tiempo de reacción para diferentes valores de a y b fijo. (A) y diferentes valores de b y a fijo. (B) Siendo la línea punteada la velocidad inicial de reacción y la línea segmentada la velocidad de reacción avanzada a 60 minutos (Valencia et al., 2019).....	20
Figura 6. Componentes principales de la pared celular (Vega & Kalkum, 2012).	21
Figura 7. Procedimiento por seguir para cada Experimento.....	24
Figura 8. Comportamiento Estándar de cuantificación de grupos alfa amino en el tiempo. (Elaboración propia).....	35
Figura 9. Fase Soluble del Hidrolizado para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción, pH nativo, a 55 [°C] con sustrato en dilución 50% (p/p). Considerando Concentraciones de Alcalase 0 [mAU/g _{champ}] (Autolisis); 0,42 [mAU/ g _{champ}]; 0,84 [mAU/ g _{champ}]; 1,68 [mAU/ g _{champ}].	43
Figura 10. Recuperación de Nitrógeno del Hidrolizado para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase 0 [mAU/ g _{champ}] (Autolisis); 0,42 [mAU/ g _{champ}]; 0,84 [mAU/ g _{champ}]; 1,68 [mAU/ g _{champ}].	44
Figura 11. Grado de Hidrólisis del Hidrolizado para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase 0 [mAU/ g _{champ}] (Autolisis); 0,42 [mAU/ g _{champ}]; 0,84 [mAU/ g _{champ}]; 1,68 [mAU/ g _{champ}].	45
Figura 12. Concentración grupos α-amino Usando Escaldado como Pretratamiento a diferentes concentraciones de enzima adicionada, a una temperatura de 55°C, 50% (w/w) y pH nativo. ...	46

Figura 13. Concentración grupos α -amino Usando Secado como Pretratamiento a diferentes concentraciones de enzima adicionada, a una temperatura de 55°C, 50% (w/w) y pH nativo. ...47

Figura 14. Concentración grupos α -amino Usando Secado + Celulasa como Pretratamiento a diferentes concentraciones de adicionada, a una temperatura de 55°C, 50% (w/w) y pH nativo.47

Figura 15. Concentración grupos α -amino en Control a diferentes concentraciones de enzima adicionada, a una temperatura de 55°C, 50% (w/w) y pH nativo.48

Figura 16. Proteína extraída por gramo de enzima utilizada. Esto para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase de 0,42 [mAU/ g_{champ}]; 0,84 [mAU/ g_{champ}]; 1,68 [mAU/ g_{champ}].....50

Figura 17. Coste de enzimas utilizadas para extraer un kilogramo de proteína. Esto para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase de 0,42 [mAU/ g_{champ}]; 0,84 [mAU/ g_{champ}]; 1,68 [mAU/ g_{champ}].50

Figura 18. Coste total considerado para obtener un kilogramo de proteína de Champiñón Ostra. Esto para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase de 0; 0,42 [mAU/ g_{champ}]; 0,84 [mAU/ g_{champ}]; 1,68 [mAU/ g_{champ}]. 51

Figura 19. Curva de Serina Estándar.61

Índice de Tablas

Tabla 1. Información Nutricional Pleurotus Ostreatus (Jumbo).....25

Tabla 2. Propiedades de las enzimas seleccionadas.27

Tabla 3. Equipos Utilizados para Escaldado.28

Tabla 4. Equipos Utilizados para Secado.....29

Tabla 5. Equipos Utilizados para Secado con Adición de Celulasa.30

Tabla 6. Diseño de Experimentos.31

Tabla 7. Equipos Utilizados para Escaldado.32

Tabla 8. Equipos Utilizados para Cuantificación de grupos α -amino.	34
Tabla 9. Costos de Enzimas Comerciales Utilizadas.....	39
Tabla 10. Parámetros "a" [mM/min], "b"[1/mM] y R2 del modelo logarítmico para cada Hidrolisis, a una temperatura de 55 [°C] y 60 [min] de tiempo de reacción.	49
Tabla 11. Equipos Utilizados Procedimiento Kjeldahl.....	57
Tabla 12. Equipos Utilizados para la elaboración reactivo OPA.	59
Tabla 13. Equipos Utilizados para la elaboración reactivo OPA.	60
Tabla 14. Resultados de prueba de significancia aplicada sobre el parámetro "a", presente en modelo ajustado para cuantificar grupos α -amino en champiñón ostra.	62
Tabla 15. Resultados de prueba de significancia aplicada sobre el parámetro "a", presente en modelo ajustado para cuantificar grupos α -amino en champiñón ostra.	62
Tabla 16. Resultados Test de Anova sobre distintas variables evaluadas.....	63
Tabla 17. Resultados Test de Tukey aplicados sobre resultados con diferencias significativas presentes en el Test de Anova.....	64

2. Introducción

Con el avance del tiempo, se espera que para el año 2030 la población mundial aumente en 1.000 millones de personas (ONU, 2022), esto añadido con que el porcentaje de personas desnutridas en el mundo creció a un 9,9% (FAO, 2020). Esto implicará que cada vez será más crucial la búsqueda de nuevas opciones alimenticias en el mercado para abastecer a la población mundial. Asimismo, al momento de seleccionar alimentos enfocados en la solución de esta problemática, el factor decisivo será la cantidad de macronutrientes que estos posean, ya que, para que el cuerpo humano sea capaz de funcionar con normalidad este necesitara de una ingesta constante de macronutrientes, entre los cuales se encontrara la proteína, la cual estará a cargo de fortalecer y mantener a los músculos, huesos y la piel (National Institutes of Health, 2021).

En la actualidad, se tiene que el método más utilizado para la obtención de alimentos proteicos es en base a fuentes animales, donde se requerirá de una alta cantidad constante de alimentos y agua para la mantención de este ganado. Asimismo, el sector ganadero es responsable aproximadamente de un 14% de las emisiones de los gases de efectos invernadero, afectando en gran medida factores medioambientales en el mundo (Bailey et al., 2014).

Además, cabe destacar que con el pasar de los años se ha visto un incremento en alimentos proteicos a base de plantas, esto ayudando en gran medida el prevenir un incremento de los gases de efecto invernadero producidos por el sector ganadero, como también generando opciones para el sector vegano y vegetariano en la población actual. Sin embargo, este tipo de alimentos proteicos carecerán de algún tipo de aminoácido esencial en su composición, siendo este dependiendo del tipo de vegetal seleccionado (Sá et al., 2020).

De esta manera, se verá una necesidad de invertir en métodos de producción de alimentos con un alto contenido de proteínas, con un enfoque sostenible mayor respecto a las tecnologías presentes, dando así la posibilidad de la utilización de hongos como sustrato inicial para cumplir estos objetivos.

Recientemente, se han reconocido a los hongos como fuentes seguras de proteínas de alta calidad, con un bajo contenido de grasas y la presencia de ingredientes funcionales en su composición. Además, esto considerando sus reducidos recursos para su producción y un perfil completo de los aminoácidos esenciales requeridos por el cuerpo humano (Ayimbila & Keawsompong, 2023).

Sin embargo, debido al alto contenido de humedad y carbohidratos en los hongos en su estado base, se requerirá la adición de procesos que modifiquen la materia prima para la obtención de la proteína de hongos como producto final. Dentro de los métodos disponibles actualmente, la hidrólisis enzimática de proteínas es considerada una excelente opción si el objetivo en el producto es un alto contenido en proteína, además de un contenido de grasas y carbohidratos ínfimos.

La hidrólisis enzimática de proteínas es un tipo de proceso biológico que se caracterizará por utilizar la proteína como materia prima y realizar una separación los enlaces peptídicos mediante

la acción de enzimas adicionadas de manera externa, para así obtener conjuntos de péptidos de menor tamaño a la proteína original y ciertos aminoácidos libres (Liceaga & Hall, 2018). Así, posterior a una centrifugación de la mezcla, se realizará la extracción de la parte soluble, esto con el objetivo de retirar las proteínas disueltas en la solución, ya que, mediante la reducción de tamaño de los péptidos, la solubilidad del material proteico aumentará, causando así que un porcentaje del contenido proteico original sea capaz de ir al medio líquido, el cual podrá ser secado para la obtención del producto objetivo.

Debido al potencial no explotado de las proteínas en base a hongos en el mercado y la reducida información en el tópico de extracción proteica de hongos, se propondrá como tema de investigación la extracción de proteínas del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante hidrólisis enzimática, seleccionado por su alto contenido en proteína en comparación con otras especies de hongos y que posee en su composición tanto aminoácidos esenciales como no esenciales (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014).

Cabe destacar, que al momento de experimentar se trabajará con 3 pretratamientos sobre el sustrato inicial, cada uno por separado, con una posterior adición de enzima comercial Alcalase. Para así discernir cual será la mejor elección para este sustrato en específico, mediante la obtención del grado de hidrólisis de la reacción, cuantificación de grupos α -amino y porcentaje extraído de proteína, siendo capaces de reflejar cual pretratamiento tiene una mayor eficiencia de extracción proteica al momento de obtener una cierta cantidad de hidrolizado objetivo.

3. Objetivos y alcances

3.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto del tipo de pretratamiento sobre la eficiencia de la hidrolisis de proteína de champiñón ostra.

3.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del pretratamiento sobre el comportamiento de la reacción de hidrolisis.
- Evaluar el efecto del pretratamiento sobre la extracción de proteínas.
- Realizar una evaluación económica del producto final y deliberar acerca de la entrada de este al mercado.

3.3 Alcances

Para esta investigación, se realizarán experimentos operando un reactor por lotes para la obtención del hidrolizado objetivo. Posteriormente, tanto al hidrolizado como a muestras retiradas en el transcurso de la hidrolisis se le aplicaran distintos métodos analíticos para la obtención de las variables requeridas en este estudio, siendo estas fase soluble, grado de hidrolisis, liberación de grupos α -amino, recuperación de nitrógeno y la consideración de una evaluación económica.

4. Antecedentes generales

4.1 Pleurotus ostreatus

El pleurotus ostreatus, o también denominado “champiñón ostra”, “hiratake”, “shimeji” o “houbitake” corresponde a un tipo de champiñón el cual crece ampliamente en áreas tropicales y subtropicales, siendo capaz de ser cultivado fácilmente de manera artificial (Krishnamoorthy & Sankaran, 2014). Además, el pleurotus ostreatus es un miembro del género Pleurotus y corresponde al segundo hongo comestible más cultivado del mundo, solo por detrás del Agaricus Bisporus (champiñón común), debido a su valor económico, ecológico y medicinal (Mihai et al., 2022)

La composición de los champiñones es alta en proteínas y baja en grasas, además de poseer una alta cantidad de vitaminas B, C, D, K y minerales. Estos también tienen una considerable cantidad de quitina y β -glucanos (Sharifi-Rad et al., 2020). Donde para el caso específico del Pleurotus ostreatus, su contenido de proteína considerando base seca estará entre 17 y 42 % del peso total, y la humedad de este en estado natural ronda el 85 y 87 por ciento (Chatterjee et al., 2021).

Cabe destacar que, este hongo en especial se caracteriza por poseer un tiempo de crecimiento menor al de otros hongos comestibles. Donde, el sustrato utilizado para su cultivo no requerirá esterilización, siendo suficiente una pasteurización previa, lo cual es menos costoso. Además, un alto porcentaje del sustrato podrá ser convertido en esporocarpo (cuerpo fructífero), aumentando así su rentabilidad (Tsefaw A et al., 2015).

Los hongos comestibles poseen las propiedades de colonizar y degradar una gran variedad de sustratos lignocelulósicos y otros residuos que son producidos principalmente bajo la actividad de las industrias agrícolas, forestales y de procesamiento de alimentos (Sánchez, 2010). Por lo que, el uso de subproductos para cultivación de hongos utilizando las tecnologías actuales puede ser una solución frente a las crisis contemporáneas, al transformar residuos no comestibles en biomasa de un alto valor económico.

Actualmente, la mayoría de los productos en base de hongos encuentran usos como suplementos alimenticios, tónicos, alimentos funcionales, nutraceúticos, fitoquímicos, micoquímicos y alimentos de diseño (Ferreira et al., 2017). Para este caso de estudio, el análisis será enfocado en los aspectos del hongo como alimento funcional derivado de un tratamiento de hidrólisis enzimática con un pretratamiento respectivo.

4.2 Hidrolisis de proteína

Las proteínas son polímeros altamente complejos, formadas por 20 diferentes tipos de aminoácidos, donde los aminoácidos se encontrarán enlazados entre sí, mediante la unión de un grupo amino propio, con un grupo carboxilo perteneciente a otro aminoácido (Damodaran et al., 2008), siendo este enlace denominado “enlace peptídico”. Los “péptidos” corresponderán a aquellas cadenas que posean entre 2 a 50 aminoácidos totales (Barrett & Elmore, 1998). Mientras que, cuando el péptido aumenta su número de aminoácidos enlazados sobre los 50, obtendrá el nombre de proteína, teniendo así que los péptidos serán precursores importantes previos a la formación de proteínas.

El término “hidrolisis de proteína” ira referido a “todas las maneras posibles de dividir proteínas con el objetivo de obtener productos (hidrolizados) con un menor peso molecular” (Lieske & Konrad, 1994). Cabe destacar que, al realizar la ruptura de las proteínas, en su mayoría estos hidrolizados corresponderán a péptidos, con el resto siendo aminoácidos libres. Además, al considerar distintos métodos de hidrolisis, estos serán principalmente mediante hidrolisis química (ácida o alcalina) e hidrolisis enzimática.

Al tener en cuenta sus usos, la hidrolisis química se utiliza más comúnmente en la industria. Mientras que, con el pasar del tiempo suele ser más frecuente la utilización de enzimas en procesos biológicos, siendo la hidrolisis enzimática uno de los métodos más prometedores de cara al futuro debido a la alta funcionalidad y valor nutricional en sus productos (Kristinsson & Rasco, 2000).

Por lo que, se ahondará en mayor profundidad sobre los distintos métodos de hidrolisis proteica:

4.2.1 Hidrolisis Química

La hidrolisis química es conseguida al quebrar enlaces peptídicos utilizando un ácido o una base. Siendo un método utilizado en industria principalmente por su bajo costo y simplicidad en ejecución. Sin embargo, este contará con las desventajas que será un método difícil de controlar, lo que llevará a variabilidad en la composición química y propiedades funcionales del producto. Esta hidrolisis proteica, utilizara químicos y solventes fuertes a extremas temperaturas y pH, lo cual llevara a una reducción en su calidad nutricional y funcionalidad. Por lo que, será restringido a utilizarlo como potenciador de sabor (Kristinsson & Rasco, 2000).

- *Hidrolisis Ácida*

Como se refiere el nombre, este tipo de hidrolisis ácida se caracterizará por el uso de ácidos. Si un compuesto donador de protones (ácido de Brønsted) cataliza la reacción, se llamará “hidrolisis ácida”. Formalmente, una parte del producto de reacción separado recibe un protón (H^+), mientras que el otro producto recibe un hidroxilo (OH^-) (Gargaud et al., 2011).

En métodos prácticos, para realizar la hidrolisis de proteínas los ácidos más utilizados son los ácidos clorhídricos y sulfúricos. Sin embargo, en la hidrolisis ácida se verá una destrucción en ciertos aminoácidos presentes (triptófano, metionina, cistina y cisteína). Añadiendo a esto, una conversión de glutamina y asparagina en ácido glutámico y aspártico respectivamente. Además, al ocurrir la hidrolisis ácida, la proteína reaccionara mayoritariamente para la obtención de

aminoácidos libres, con cantidades diminutas de péptidos pequeños. El proceso se caracteriza por la adición de significantes cantidades de sal, por lo que algunos fabricantes posteriormente remueven la sal parcial o completamente, para así evitar el efecto negativo relacionado al crecimiento de microorganismos (Pasupuleti & Braun, 2010).

- *Hidrolisis Alcalina*

Asimismo, en el caso de la hidrolisis alcalina esta trabajara con compuestos de pH base (reactantes alcalinos). Usualmente, la hidrolisis alcalina será trabajada a una baja temperatura y presión, donde esta podría ser completada a condiciones ambientes. Sin embargo, una de sus desventajas radicara en el tiempo de proceso, pudiendo llevar horas o incluso días para completar la hidrolisis. Por otro lado, la hidrolisis alcalina también podrá ser utilizada en pretratamientos para ciertas materias primas, como ocurre en el tratado de madera mediante el proceso Kraft para así eliminar lignina y aumentar la reactividad de los polisacáridos o también, en la remoción de grupos acetilo de la hemicelulosa para mejorar la accesibilidad de enzimas hidrolíticas (Mekala et al., 2014).

En métodos prácticos, hasta el momento no se encuentran aplicaciones comerciales de hidrolizados proteicos alcalinos en biotecnología. Sin embargo, en la industria alimenticia, los hidrolizados proteicos alcalinos son utilizados a escala comercial. Algunos aminoácidos como la serina y treonina son destruidos durante la hidrolisis alcalina, pero este no será el caso para el triptófano, dando así la oportunidad de utilizarse como un método para determinación de triptófano en materias primas (Pasupuleti & Braun, 2010).

4.2.2 Hidrolisis Enzimática

Previamente, dentro de las enzimas alimentarias estas pueden ser clasificadas en dos tipos. Aquellas que son añadidas a las comidas (enzimas exógenas) para causar un cambio deseado y aquellas que ya existen de por si en la comida (enzimas endógenas) que pueden o no ser responsables de las reacciones que afectan la calidad del alimento. Las enzimas exógenas pueden ser obtenidas de una variedad de fuentes, donde la elección del tipo de enzima será basada al considerar costos y funcionalidad, siendo el aspecto de la funcionalidad asociada a actividad catalítica, selectividad y estabilidad bajo las condiciones que prevalecen durante la aplicación específica. Mientras que, para el caso de las enzimas endógenas, estas poseerán un desafío mayor al momento de controlarlas, debido a que se encuentran presentes en la comida en una gama de niveles diferentes, y existiendo limitaciones respecto a cómo puede ser manejado el producto alimenticio para modular la acción de la enzima (Damodaran et al., 2008).

La hidrolisis enzimática, es un tipo de hidrolisis la cual utilizará mayoritariamente enzimas proteolíticas (proteasas) para realizar la ruptura de los enlaces peptídicos dentro del material proteico inicial. Su principal ventaja, como fue mencionado anteriormente, radicara en las especificidad de cada enzima. Ya que, las enzimas catalizan solamente una reacción específica y funcionan mediante la formación de un complejo con el sustrato. Las proteasas serán de las enzimas mejor caracterizadas, siendo las preparaciones de enzimas proteolíticas el grupo que genera mayor cantidad de ingresos económicos respecto a otros tipos de enzimas utilizadas en

el mercado. Por otro lado, las proteasas serán categorizadas de acuerdo con los enlaces peptídicos que estos hidrolizan y el mecanismo sobre el que actúan. Respecto a sus mecanismos, estos se clasificarán en endopeptidasas o exopeptidasas. Las endopeptidasas hidrolizarán los enlaces peptídicos de los aminoácidos no terminales (dentro de la molécula), produciendo así péptidos compuestos por un alto número de aminoácidos. Mientras que, las exopeptidasas hidrolizarán los enlaces peptídicos de los aminoácidos terminales, produciendo así un gran número de aminoácidos libres. Así, se tendrá que, en la hidrólisis proteica de alimentos, las endopeptidasas serán ocupadas en la mayoría de los casos, mientras que, si se requiere una degradación más completa se añadirá cierta cantidad de exopeptidasas (Kristinsson & Rasco, 2000).

Respecto al proceso de la hidrólisis enzimática, se han propuesto varias alternativas para el proceso. Donde, al realizar una vista general, se verán los siguientes pasos (Liceaga & Hall, 2018):

- El proceso comenzará con una homogenización de la materia prima (siendo esta, el alimento completo o proteína que ha sido extraída, aislada o concentrada previa a la hidrólisis). Dependiendo de la actividad autolítica de la proteína, se evaluará una pasteurización posterior a la homogenización.
- Después, se hará una variación en la temperatura y/o pH del material homogenizado, con el objetivo de buscar las condiciones óptimas para asegurar una alta actividad enzimática.
- Así, se procederá con la ruptura de los enlaces peptídicos en la mezcla de reacción, que se caracterizará por una fase inicial con una velocidad alta de reacción enzimática donde los péptidos con elevadas cantidades de enlaces son hidrolizados en sitios específicos. Y, se denotará que paulatinamente irá decreciendo la velocidad de reacción enzimática tanto por los distintos tipos de inhibición, principalmente debido a agotamiento por sustrato e inhibición por producto.
- Posteriormente a la hidrólisis, la materia prima procesada tendrá un ajuste en pH, pasteurización o adición de químico para inactivar la enzima completamente, debido a que ya se debería haber obtenido la hidrólisis requerida inicialmente.
- De esta manera el compuesto acuoso ya hidrolizado, será enfriado y atravesará un proceso de separación (centrifugación, ultrafiltración, etc.) y un almacenamiento del compuesto objetivo (congelado o secado spray).

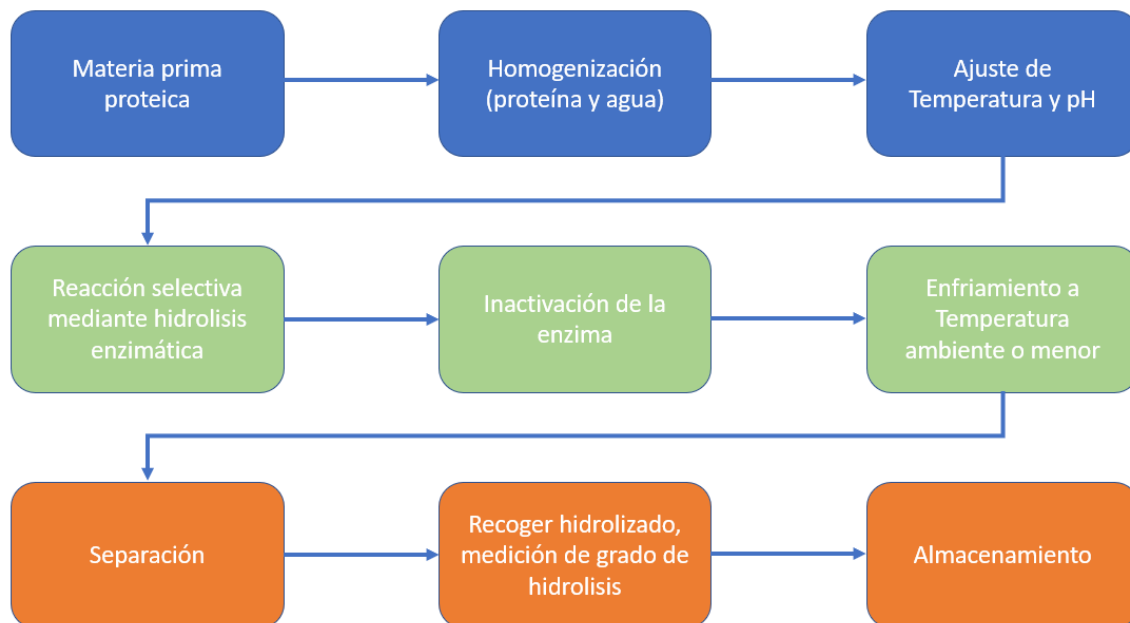


Figura 1. Procedimiento general de hidrólisis enzimática de proteínas (Liceaga & Hall, 2018).

4.3 Caracterización de la hidrólisis enzimática

De esta manera, para realizar una caracterización de la hidrólisis enzimática, se requerirá de ciertos procedimientos aplicados a los productos obtenidos en la hidrólisis enzimática de proteínas. Estos procedimientos serán divididos en 2 tipos:

4.3.1 Técnicas Analíticas

Estos procedimientos son aplicados para identificar y cuantificar sustancias químicas específicas en una muestra o analito. Siendo este el paso posterior de conseguir los productos objetivos de la hidrólisis. Para este caso, como técnicas analíticas se describirán aquellas para cuantificar grupos α -amino y porcentaje de nitrógeno sobre los analitos.

- *Método OPA*

La técnica OPA o “o-ftaldialdehído”, cuantificara los grupos α -amino liberados por la hidrólisis ocurrida a la materia prima, los cuales podrán ser extrapolados al cálculo del grado de hidrólisis requerido. Así, la cuantificación de los grupos α -amino se logrará mediante un análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 340 [nm], ya que, al adicionar o-ftaldialdehído y otro reactivo variable en la mezcla ya hidrolizada, se formará un compuesto que tendrá la cualidad de una absorbancia máxima en esa longitud de onda (Church et al., 1983).

Originalmente, el método OPA se lograba al utilizar como analito el hidrolizado, en adición de los reactivos OPA y “ β -mercaptoetanol”, como se podrá ver en la Figura 2 (Church et al., 1983):

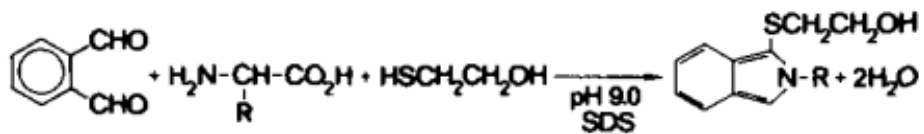


Figura 2. Reacción de método OPA Original.

Donde "R" será el reactivo (aminoácido, péptido o proteína) que contenga esa amina primaria. Por otro lado, se tendrá que el reactivo β -mercaptoetanol será considerado un peligro al ser humano, debido a su carácter tóxico y explosivo, con lo cual se comenzó a buscar distintos reactivos sustitutos con propiedades ambientalmente más aceptables. De esta manera, mediante el uso de ditioneitol (DTT) como sustituto pudo obtener un resultado similar al momento del análisis espectrofotométrico, esto con el añadido de poder utilizar la serina como el estándar y así poder realizar una curva de calibración con absorbancias conocidas, ya que, en las reacciones la serina tiende a ser muy cercano a la respuesta promedio de la totalidad de aminoácidos (Nielsen et al., 2001).

Como se dijo previamente, debido a que el método OPA corresponderá a una técnica aplicada a la materia prima posterior a la hidrólisis, se podrá trabajar a una temperatura ambiente y presión atmosférica. Por otro lado, al momento de realizar el cálculo de enlaces peptídicos rotos o totales, primer se deberá hacer la medición de los grupos α -amino originales previo a la adición de OPA, ya que, la técnica no distinguirá entre grupos α -amino obtenidos por hidrólisis o los pertenecientes al péptido original.

- *Método TNBS*

El método TNBS o "Ácido trinitrobenzenosulfónico", al igual que el método OPA consistirá en la medición de los grupos α -amino liberados por la hidrólisis ocurrida al hidrolizado. Al momento de estos ser cuantificados, se realizará un análisis espectrofotométrico a una longitud de onda de 340 [nm], debido a que el producto de la reacción (Cromóforo) tendrá una alta capacidad de absorción a esa longitud de onda (Adler-Nissen, 1979).

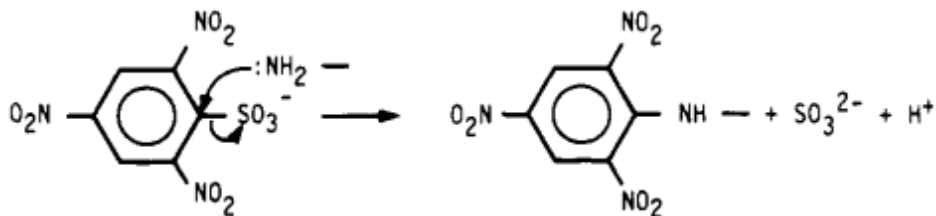


Figura 3. Reacción de método TNBS.

La reacción se llevará a cabo bajo unas condiciones alcalinas de pH y será terminada reduciendo el pH. Mientras que, una desventaja de este método frente al OPA radicará en que el tiempo necesario para incubación (alrededor de 60 minutos) será más de 10 veces mayor que para el método OPA (Spellman et al., 2003).

- *Método Kjeldahl*

De igual manera, el método Kjeldahl corresponderá a una técnica analítica empleada para la determinación del porcentaje de nitrógeno sobre las muestras objetivo. Este método consistirá en 3 fases consecutivas, siendo estas las fases de Digestion, Destilación y Titulación. Con este método, se busca que la totalidad del nitrógeno presente en la muestra sea convertida a amoniaco en la fase de Digestion y posteriormente a amonio en la fase de Destilación, para así que este compuesto sea titulado correctamente. Para este método, se trabajará a temperaturas elevadas durante tiempos alargados para asegurar la completa digestión de la muestra. Si se requiere enfatizar en el procedimiento, revisar “**Anexo A**”.

4.3.2 Métodos de Caracterización

Los métodos de caracterización serán utilizados con la información obtenida en las técnicas analíticas previamente descritas, con lo cual existirá una dependencia directa de uno sobre el otro. Los métodos de caracterización utilizados serán los siguientes:

- *Grado de Hidrolisis*

Como se verá en la Figura 1, una sección del procedimiento general ira referido a la recolección del hidrolizado y medición de grado de hidrolisis. Este paso será crucial al momento de cumplir el objetivo general de este estudio. El grado de hidrolisis corresponderá al porcentaje de enlaces peptídicos que han sido hidrolizados en el proceso, siendo así, el parámetro clave para monitorear la reacción de hidrolisis (Nielsen et al., 2001):

$$\text{Grado de Hidrolisis (\%GH)} = \frac{h}{h_{tot}} * 100\% \quad (1)$$

Así, h y h_{tot} serán definidos respectivamente como el número de enlaces peptídicos hidrolizados y el número total de enlaces peptídicos en la mezcla de reacción. De igual manera, el grado de hidrolisis estará correlacionado con propiedades funcionales del producto, como son la solubilidad, capacidad emulsionante, capacidad espumante, capacidad de absorción de grasas y un factor sensorial importante como será la amargura (Petrova et al., 2018).

Respecto al grado de hidrolisis, se verá que la propiedad funcional más importante será la solubilidad del producto, ya que, esta afectará directamente las otras propiedades previamente mencionadas. Siendo dependiente de la afinidad que tenga al agua u otros solventes polares. Así, las interacciones hidrofóbicas reducirán la solubilidad del producto al promover interacciones proteína-proteína, mientras que las interacciones hidrofílicas aumentarán la solubilidad de este, al promover interacciones proteína-agua (Liceaga & Hall, 2018). Cabe destacar, que al aumentar el grado de hidrolisis la solubilidad del producto será cada vez más alta.

Así, al momento de estudiar el comportamiento de la curva de hidrolisis, cabe tener en cuenta los mecanismos que afectan su forma. Siendo estos, agotamiento del sustrato, inhibición por productos de la hidrolisis e inactivación térmica de la enzima.

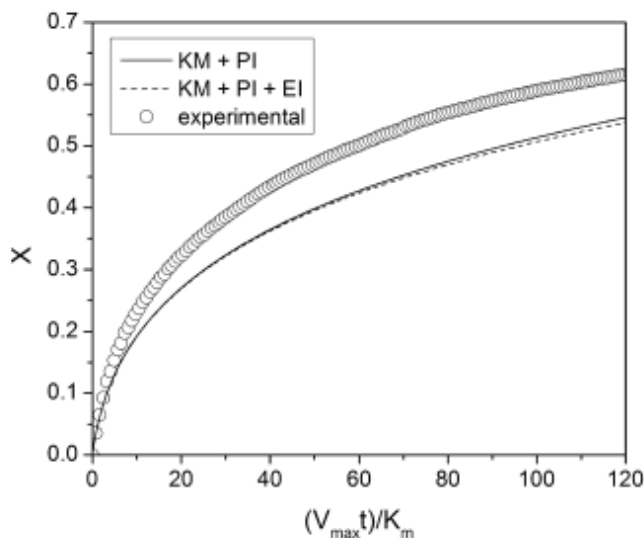


Figura 4. Simulación del grado de conversión (X) vs tiempo adimensional, utilizando un modelo cinético (KM), considerando inhibición por producto (PI) e inactivación enzimática (EI) (Valencia et al., 2014).

Donde, el factor que posee el efecto más significativo en esta curva corresponderá a la inhibición por productos de hidrolisis, como se puede denotar en la Figura 2. Este hallazgo es relevante para la aplicación tecnológica de la hidrolisis enzimática de proteínas, debido a que la eficiencia del proceso puede ser mejorada si los productos son retirados del reactor a medida que se producen (Valencia et al., 2014).

De este modo, para conocer el grado de hidrolisis en el hidrolizado posteriormente tratado se emplearán distintos tipos de métodos en el mercado, siendo los más utilizados los métodos OPA y TNBS (Spellman et al., 2003).

Para el cálculo con estos métodos se utilizará la ecuación N°2:

$$\text{Grado de Hidrolisis (\%GH)} = \frac{NH_{(t)} - NH_{(0)}}{NH_T} * 100 \quad (2)$$

Siendo referido a la resta entre la cuantificación de los grupos α -amino en un tiempo t e inicial, dividido por los grupos α -amino totales en el sustrato.

- *Recuperación de Nitrógeno*

La recuperación de nitrógeno, como dice el nombre corresponde a un parámetro que cuantificara la proporción de nitrógeno recuperado en la fase soluble del hidrolizado posterior a la hidrolisis

enzimática de proteínas, esto comparado respecto a la cantidad original de nitrógeno contenido en la materia prima original. Así, se utilizará la ecuación N° 3 (Benjakul & Morrissey, 1997):

$$\text{Recuperacion de nitrógeno (RN)} = \frac{\text{nitrógeno total en fase soluble}}{\text{nitrógeno total en sustrato}} * 100 \quad (3)$$

Donde, se obtendrá la cantidad de nitrógeno total en fase soluble y en sustrato usando el método Kjeldahl, donde su procedimiento se especificará en el “Anexo A”.

- *Parámetros empíricos sobre la hidrolisis enzimática*

La cuantificación de grupos α-amino, como fue mencionado en anterioridad estará enlazada directamente con la hidrolisis enzimática de proteínas, debido a que así se podrá realizar un seguimiento de la cantidad de enlaces rotos durante el tiempo total de la hidrolisis enzimática. Siendo esta necesaria al momento de obtener el grado de hidrolisis, como también al momento de obtener un modelo empírico asociado a la hidrolisis enzimática, con sus parámetros empíricos respectivos.

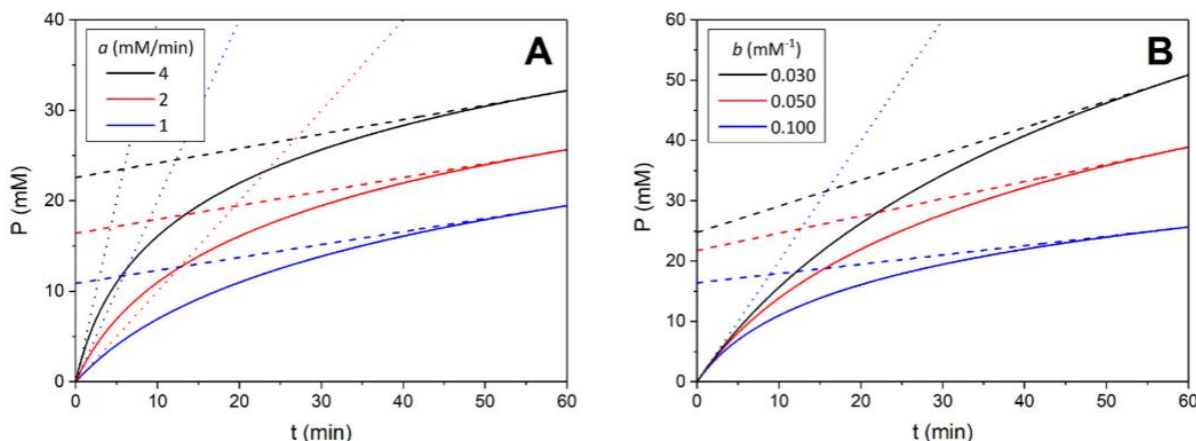


Figura 5. Transcurso de tiempo de reacción para diferentes valores de a y b fijo. (A) y diferentes valores de b y a fijo. (B) Siendo la línea punteada la velocidad inicial de reacción y la línea segmentada la velocidad de reacción avanzada a 60 minutos (Valencia et al., 2019).

Como se verá en la Figura N° 5 (tanto el grafico A como B), la formación de producto se caracterizará por tener una velocidad inicial de formación de producto más rápida en un comienzo, respecto a la velocidad de formación de producto presente al final de la hidrolisis que ira bajando paulatinamente con el pasar del tiempo. Esto ocurrirá principalmente a factores previamente mencionados, como lo son el agotamiento del sustrato, inhibición por productos de la hidrolisis e inactivación térmica de la enzima.

Ahora, al modelar matemáticamente el comportamiento de la formación de producto, se ha observado que el implementar una ecuación logarítmica se asemeja con una alta precisión al comportamiento real visto en la hidrolisis enzimática, siendo esta la ecuación logarítmica (Valencia et al., 2019):

$$P(t) = \frac{1}{b} * \ln (a * b * t + 1) \quad (4)$$

Siendo P la concentración de grupos α -amino en el tiempo, además de tener los parámetros “a” y “b”, siendo el primero la velocidad de reacción inicial y el segundo un parámetro relacionado con la velocidad de reacción en fases avanzadas. Permittiendo de esta manera, tener documentado estos parámetros empíricos existentes al tratar con cierto sustrato en sus condiciones respectivas (T° , pH, tiempo reacción, concentración enzima) y poder realizar comparaciones entre distintos estudios para encontrar aquellos parámetros que se acerquen al optimo teórico y maximizar la obtención de hidrolizado. Además, para la obtención de estos parámetros empíricos, se recomendará el uso del método de los mínimos cuadrados sobre este modelo empírico.

4.4 Pretratamiento

Ahora, al realizar énfasis en la estructura y compuestos específicos de los hongos, estos al igual que los alimentos en base de plantas, poseerán una pared celular que se encargara de tener un rol de soporte, protección y de almacenar la mayoría de los nutrientes del alimento en específico. Para las frutas y verduras, esta pared celular se encontrará formada principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectinas (Nyman & Haskå, 2013). Mientras que, tanto para las bacterias como hongos, los componentes principales serán quitina, glucanos, manoproteínas y glicoproteínas. Siendo la quitina el componente centrado en cumplir el rol estructural de esta pared celular, además de ser el componente más cercano a la membrana plasmática del hongo o bacteria (Lord & Vyas, 2019).

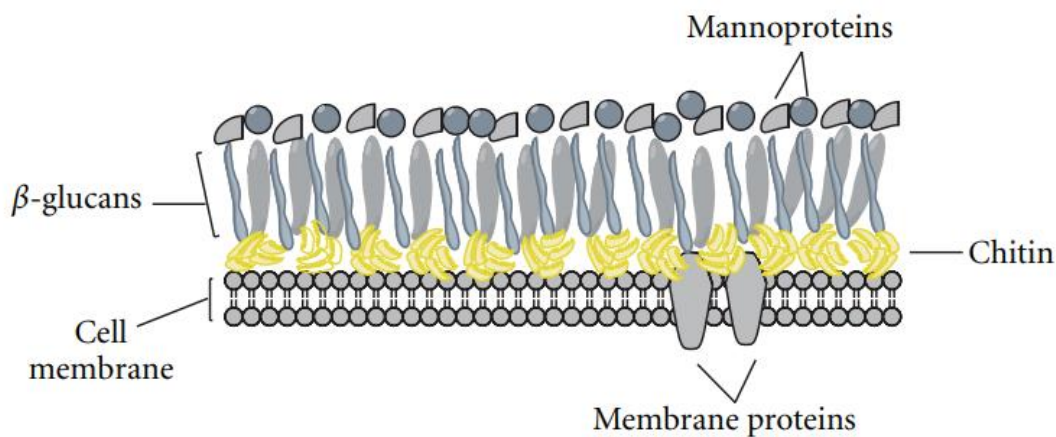


Figura 6. Componentes principales de la pared celular (Vega & Kalkum, 2012).

Así, al momento de realizar la hidrolisis enzimática de proteínas en hongos, su pared celular será considerada un inconveniente. Esto debido a que, las proteínas intracelulares deben ser expuestas para propiciar la acción catalítica de la proteasa añadida, siendo esto logrado

mediante la ruptura celular. Para lograr esta modificación en la pared celular, se han propuesto el uso de diferentes pretratamientos sobre el sustrato para causar cambios físicos en la pared celular del hongo y así que la interacción entre la enzima aplicada y el contenido de proteína propia del hongo ocurra sin inconvenientes (Ugalde & Castrillo, 2002). Dentro de los pretratamientos a mencionar, se tendrán en cuenta solo los utilizados previos a realizar una hidrólisis enzimática de proteínas:

4.4.1 Escaldado

Este pretratamiento consistirá en agregar el sustrato troceado a un recipiente que contenga agua desionizada a una temperatura alta, siendo esta entre 90 y 100 grados Celsius durante un tiempo menor a 5 minutos. Posteriormente, el sustrato sufrirá un choque térmico al traspasarlo a otro recipiente con agua desionizada a temperatura ambiente. El pretratamiento se centra en realizar una deformación a la pared celular, con el añadido de generar una inactivación de las enzimas propias del sustrato en el proceso (Palupi et al., 2011).

4.4.2 Secado

El secado, será el pretratamiento más sencillo, donde el sustrato troceado se pondrá en un recipiente durante un periodo de tiempo alargado mayor a 6 horas a una temperatura entre 40 y 60 grados Celsius. La deformación de la pared celular será causada por el tiempo alargado del secado, al mismo tiempo reduciendo la humedad del sustrato al mínimo. A diferencia del escaldado, este proceso no inactivara completamente las enzimas propias del sustrato (Ang & Ismail-Fitry, 2019).

4.4.3 Adición de Celulasa más Secado

Al igual que el pretratamiento anterior, se realizará un secado alargado durante un tiempo mayor a 6 horas a una temperatura entre 40 y 60 grados Celsius. Ahora, la diferencia radicara que al realizar la hidrólisis enzimática sobre *Pleurotus Ostreatus*, se añadió una dosis de celulasa y proteasa al momento de comenzar la hidrólisis sobre el sustrato ya secado. Este pretratamiento como tal, tiene el objetivo de ir hidrolizando y rompiendo los enlaces presentes propios de la quitina mediante la adición de celulasa, así mejorando la disponibilidad de las proteínas dentro de la célula al interactuar con la proteasa añadida (Zhu et al., 2022). Ahora, el uso de celulasa en vez de quitinasa para romper la pared celular es aceptable dentro del marco teórico y práctico, ya que, el enlace que busca romper la celulasa y la quitinasa corresponderá al mismo (enlace β -1,4 glucosídico) (Poshina et al., 2018).

4.4.4 Liofilización

Este proceso consistirá en tener el sustrato troceado, que se almacenará en un congelador a temperaturas bajo cero. Posteriormente, este alimento congelado se someterá a presiones menores a la atmosférica mediante el uso de bombas de vacío, causando así, una evaporación del agua presente en el alimento, y que consecuentemente esta evaporación provocará deformaciones en la pared celular del sustrato. Por otro lado, las enzimas presentes originalmente en el alimento se mantendrán intactas (Goswami et al., 2022).

4.5 Hidrolizados proteicos de Hongos

Aparte de la calidad nutricional, la funcionalidad de las proteínas es un factor de alta importancia, debido al efecto que estas tendrán en la digestión y consumo del alimento en cuestión. Las proteínas son moléculas altamente funcionales utilizadas en industrias químicas, farmacéuticas y alimenticias para procesos como la emulsificación, formación de espuma, mejora de la viscosidad y encapsulación. Así, la funcionalidad de las proteínas ira referido a las propiedades que contribuyen al sabor, textura, estabilidad del alimento y su apariencia final (Liceaga & Hall, 2018).

Respecto a los hidrolizados proteicos, estos se caracterizarán por tener cambios en sus propiedades funcionales (solubilidad, propiedades emulsificantes, capacidad de retención de agua y propiedades espumantes), lo cual implicará un cambio en la calidad el alimento y el impacto que tendrá sobre el cuerpo humano (Kristinsson & Rasco, 2000).

Ahora, al enfocarse en productos de origen fungí, se han realizado estudios de hidrolisis de proteínas sobre hongos shiitake, ostra, bunashimeji y enoki utilizando tallo de bromelina como enzima proteolítica. Donde, como resultados se obtuvo un grado de hidrolisis entre 53 y 65 % para la totalidad de los sustratos, al realizar la hidrolisis a 40°C durante 20 horas. Siendo este hidrolizado añadido a sopa de pollo, resultando en mejoras en el aroma, sabor y textura en la boca (Ang & Ismail-Fitry, 2019). También, las proteínas de hongos han sido una fuente para la extracción de aminoácidos que proporcionan el sabor umami, como el glutamato y el aspartato. Siendo un sabor deseable en las artes culinarias (Da Silva, 2021).

5. Metodología

Como fue previamente mencionado, el objetivo general de este estudio radica en evaluar el efecto del tipo de pretratamiento sobre la eficiencia de la hidrolisis enzimática de proteínas. Para esto, posteriormente a la aplicación del pretratamiento en específico, se utilizaron reactores por lotes para realizar la hidrolisis, donde se obtuvo tanto los hidrolizados como las muestras retiradas en el transcurso de la hidrolisis. Así, se aplicaron distintos métodos analíticos para la obtención de las variables requeridas en este estudio, siendo estas fase soluble, grado de hidrolisis, liberación de grupos α -amino, recuperación de nitrógeno y costos asociados.

Así, el procedimiento experimental a seguir es el siguiente:

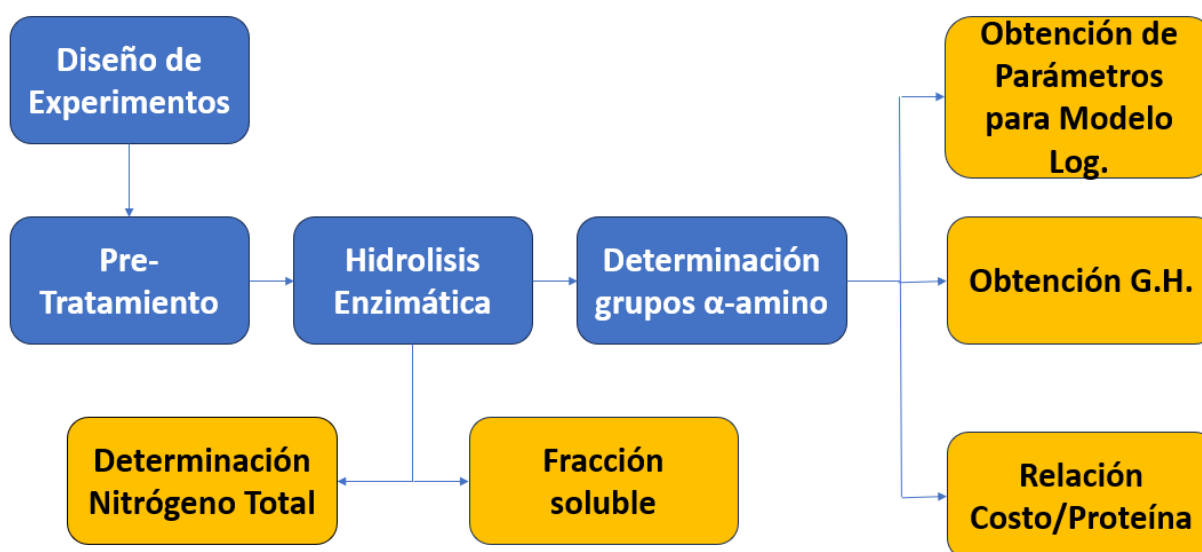


Figura 7. Procedimiento por seguir para cada Experimento.

De esta manera, se definió una metodología asignando las materias primas, equipos y parámetros de operación a utilizar.

5.1 Diseño de Experimentos

Primero, al momento de definir el diseño de experimentos, se decidió estudiar la hidrolisis enzimática de proteínas de *Pleurotus Ostreatus* (champiñón ostra) utilizando el sustrato en una dilución 50% (peso/peso), en pH nativo sin control, a una temperatura de operación de 55 [°C] durante un periodo de 60 minutos. En la totalidad de los experimentos, se decidió el variar entre 3 pretratamientos aplicados sobre el sustrato, siendo estos el uso de Escaldado, Secado y Secado más adición de Celulasa. Además, se utilizaron 3 concentraciones de enzima comercial Alcalase diferentes en cada pretratamiento, siendo respectivamente estas 0,42; 0,84; 1,68 [mAU/g champiñón]. Con el añadido de que se realizaron experimentos sin enzima Alcalase adicionada (Autólisis) para cada pretratamiento. También, será importante destacar que se estudió la significancia entre aplicar un pretratamiento o no, por lo que se añadieron 2

experimentos como control, sin el uso de pretratamientos previos, con una concentración de enzima Alcalase añadida de 0 y 1,68 [mAU/g champiñón] respectivamente.

Para realizar estas hidrolisis, primero el sustrato original fue troceado para que tenga el pretratamiento respectivo, donde posteriormente se añadió la cantidad de agua desionizada necesaria para obtener una mezcla 50% (peso/peso), respecto a la cantidad de champiñón ostra original previa al pretratamiento.

Seguidamente, se realizó la hidrolisis enzimática de proteínas durante un periodo de 60 minutos considerando las condiciones de pH y T° previamente mencionadas, donde se extrajeron 8 muestras de 0,5 [mL] de la mezcla sustrato/agua desionizada durante el tiempo especificado, que serán usados para cuantificar la cantidad de grupos α -amino en el transcurso del tiempo.

Así, esta mezcla después del tiempo respectivo fue centrifugada para obtener el porcentaje de fase soluble en la muestra, en conjunto de su fase insoluble. Después, esta fase soluble del hidrolizado fue sometida al método Kjeldahl para conseguir la cantidad de nitrógeno en el hidrolizado y así compararlo con la cantidad inicial de nitrógeno del sustrato.

Por otro lado, las muestras extraídas durante la hidrolisis se usaron para obtener la cantidad de grupos α -amino en el transcurso del tiempo mediante el método OPA, y así conseguir los puntos de cuantificación de producto en el tiempo. Además, de esta manera se obtuvieron los parámetros “a” y “b” del modelo logarítmico para cada experimento y también el grado de hidrolisis del hidrolizado posterior a la hidrolisis.

Así, en los siguientes puntos se definieron las materias primas a utilizar en conjunto de los pasos ya explicados en el diseño de experimentos en mayor detalle, considerando equipos a utilizar, parámetros de operación y reactivos de interés.

5.2 Materia Prima y Reactivos

5.2.1 Sustrato

Como sustrato, se eligió champiñón ostra (*Pleurotus Ostreatus*) comercializado en el supermercado Jumbo, debido a su fácil obtención y constante reabastecimiento en el lugar de compra. Este sustrato cuenta con la siguiente información nutricional según el proveedor:

Tabla 1. Información Nutricional Pleurotus Ostreatus (Jumbo)

Información Nutricional	Por cada 100 gramos
Energía [kcal]	33
Proteínas [g]	3,31
Grasas Totales [g]	0,41
Hidratos de Carbono disponibles [g]	6,09
Azúcares totales [g]	1,11
Sodio [g]	18

Cabe destacar que, al momento de referirse a esta información nutricional, esta se usó estrictamente como idea de la información nutricional real, debido a que esta información es estándar para todos los champiñones ostra en el mercado.

De esta manera, para obtener cantidad la real de proteína en el sustrato, siendo este el macronutriente de interés en este estudio, se utilizó el método Kjeldahl especificado en el “**Anexo A**” para obtener el porcentaje de nitrógeno en la muestra y así el porcentaje de proteína total, siendo este de un **2,05** [%].

5.2.2 Enzima

Al considerar las enzimas a utilizar en el estudio, se optó por seleccionar las siguientes enzimas comerciales.

- *Alcalase 2,5 L*

Esta enzima comercial corresponde a una enzima proteasa producida a partir de origen bacteriano, específicamente *Bacillus Licheniformis*. Siendo esta un derivado de la proteasa subtilisina. Esta proteasa comercial está compuesta por endo-proteasas, rompiendo así los enlaces internos de la proteína a hidrolizar. Respecto a su temperatura y pH recomendado para operación, estos se encuentran en el rango de 60 a 75 [°C] y 6,5 a 10 de pH correspondientemente. Además, la actividad específica de la Alcalase es de 2,5 [AU/g_{enzima}] según informado por el proveedor (Novozymes, 2024).

- *Actividad proteolítica Alcalase [AU/g]*

Esta unidad se referirá a “Anson Unit por gramo”, entregada por el proveedor del producto en sí. La unidad AU corresponde a la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 [μmol] de L-tirosina a partir de hemoglobina por minuto a 25 [°C] y 7,5 de pH. Donde en este caso, 1 gramo del producto Alcalase, contiene 2,5 AU. Siendo estas unidades utilizadas en todas las fases de la metodología para cuantificar la cantidad de proteasa aplicada.

Por otro lado, al momento de definir las unidades de actividad proteolítica, estas se encuentran valoradas respecto al sustrato en cuestión que se utilizó para cuantificar la actividad proteolítica en el laboratorio del proveedor, y no referidas a la cuantificación del uso de proteasas sobre champiñón ostra para la formación de producto.

- *Carezyme 4500 L*

Esta enzima comercial corresponde a una enzima celulasa producida a partir de origen fúngico, específicamente de los hongos *Aspergillus*. Siendo este producido mediante una fermentación sumergida de un microorganismo *Aspergillus* genéticamente modificado. Esta celulasa comercial está compuesta por endo y Exo-glucanasas, rompiendo así los enlaces internos y externos al hidrolizar (Lopez, 2019). Respecto a su temperatura y pH recomendado para operación, estos se encuentran en el rango de 40 a 60 [°C] y 7 a 9 de pH correspondientemente. Además, la actividad específica de la Carezyme es de 4500 [CNU-CA/g_{enzima}] según informado por el proveedor (Merck, 2022; Novozymes, 2014).

- *Actividad celulítica Carezyme [FPU/mL_{enzima}]*

Esta unidad se refiere a “Filter Paper Unit” por mililitro de enzima. La unidad FPU corresponderá a la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 2 [mg] de glucosa a partir de 50 [mg] celulosa de papel filtro en 60 minutos (Adney & Baker, 1996). Ahora, la enzima Carezyme 4500L, posee su actividad celulítica ya estandarizada con anterioridad, siendo esta 81,74 [FPU/mL] (Lopez, 2019). Estas unidades son utilizadas en todas las fases de la metodología para cuantificar la cantidad de celulasa aplicada.

Así, para resumir las enzimas que se utilizaron se tiene la Tabla N°2:

Tabla 2. Propiedades de las enzimas seleccionadas.

Nombre Comercial Enzima	Origen	Calificación de Enzima	Tipo de Enzima	Rango T° [°C]	Rango pH
Alcalase	Basado en Bacterias	Proteasa	Endo-Proteasa	60-75	6,5-10
Carezyme	Basado en Hongos	Celulasa	Endo-Glucanasas + Exo-Glucanasas	40-60	7-9

De esta manera, para la relación (enzima/sustrato) se utilizaron valores donde es posible una contrastación entre cada uno de los experimentos.

- *Calculo Concentración Proteasa [AU/g_{champiñon}]*

Primero, para la cantidad añadida de Alcalase, se decidió basarse en estudios donde se varió la cantidad de esta enzima sobre esquelón de salmón usado como sustrato, utilizando la concentración intermedia de enzima como tope (Valencia et al., 2021). Esto con la diferencia que se reducirá la cantidad de enzima adicionada en proporción a la relación del contenido de proteína existente entre el esquelón de salmón y el champiñón ostra. Usando así, la ecuación N°5:

$$E_{proteasa, champ} \left[\frac{mAU}{g_{champ}} \right] = \frac{E_{proteasa, esquelon} \left[\frac{mAU}{g_{esquelon}} \right]}{\%_{proteina, esquelon} \left[\frac{g_{proteina}}{g_{esquelon}} \right]} \%_{proteina, champ} \left[\frac{g_{proteina}}{g_{champ}} \right] \quad (5)$$

Así, considerando que la concentración de enzima elegida como tope en este caso fue de 13 [mAU/g_{esquelon}], esto sería una concentración de 1,68 [mAU/g_{champiñon}]. Debido a que el contenido de proteína del esquelón y champiñón es de 15,83% y 2,05% respectivamente. Obteniendo así 3 concentraciones de enzima, siendo estas 1,68; 0,84 y 0,42 [mAU/g_{champiñon}] en cada caso. Para verificar los cálculos realizados referente a la dosis de celulasa adicionada, revisar “Anexo B”.

- *Calculo Concentración Celulasa [FPU/g_{quitina}]*

Después, para la cantidad añadida de Carezyme, se decidió basarse en estudios donde se varió la cantidad de esta enzima sobre orujo de uva tinto usado como sustrato, utilizando una concentración de celulosa en el rango de este trabajo como tope (Lopez, 2019). Esto con la diferencia que, se reducirá la cantidad de celulasa adicionada en proporción a la relación del contenido de celulosa o quitina existente en el orujo de uva tinto y el champiñón ostra. A modo de cálculo, se supuso que existirá el mismo efecto entre hidrolizar con celulasa un cierto contenido de celulosa o quitina respectivamente. Así, la concentración de Celulasa que usada fue de 76,72 [FPU/g_{quitina}] decidida arbitrariamente, concordando con el rango de concentración de celulasa de 30 a 90 [FPU/g_{celulosa}]. Para verificar los cálculos realizados referente a la dosis de celulasa adicionada, revisar “**Anexo C**”.

5.3 Pretratamientos

Para la realización de los pretratamientos sobre el *Pleurotus Ostreatus* (champiñón ostra). Se eligieron 3 pretratamientos, que fueron utilizados por separado en cierto número de experimentos y que posteriormente fueron ser sometidos a la hidrolisis enzimática de proteínas.

Los pretratamientos elegidos son el uso de Escaldado, Secado y Secado más la adición de Celulasa. Ahora, para cada pretratamiento se tuvieron los siguientes sustratos y reactivos necesarios, además de selección de equipos, procedimientos de trabajo y parámetros operacionales:

5.3.1 Escaldado

Sustratos y reactivos necesarios:

- ✓ Agua desionizada
- ✓ Champiñón Ostra

Equipos Utilizados:

Tabla 3. Equipos Utilizados para Escaldado.

Equipo	Especificación
Trituración	Batidora de Inmersión Oster
Calentado Agua	Hervidor Black HE300
Balanza	Mettler Toledo PL1502-S

Procedimientos de trabajo y parámetros operacionales:

- Primero se tomaron 500 gramos de champiñón ostra (número elegido como base de cálculo), y se le realizo un troceado fino con cuchillo o símil.
- Se hizo un pesaje del champiñón ostra.
- El champiñón ostra troceado fue limpiado aplicando un flujo continuo de agua desionizada durante un minuto.

- El champiñón ostra estuvo puesto dentro de un recipiente con 500 [mL] de agua caliente a una temperatura de 95 [°C] aproximadamente, durante 4 minutos.
- Posteriormente, se separó el champiñón ostra del agua caliente y se traspasó a otro recipiente con 500 [mL] de agua a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Ya pasado el tiempo, al champiñón ostra ya escaldado se le quito el líquido que haya absorbido en el proceso, usando un colador durante 1 minuto. Después, el sustrato se traspasó a un recipiente vacío.
- Se hizo pesaje del champiñón ostra ya escaldado. (A momentos de señalar los gramos de champiñón en las unidades de ciertos parámetros, estos son referidos a los gramos **previos al escaldado**. Aun así, el peso de estos no suele tener más de 1% de variación)
- Así, el champiñón ostra se trituro con la batidora Oster durante 1 minuto para obtener una mezcla homogénea para utilizar.
- Después, se pesaron 25 gramos de triturado y se le agregaron 25 gramos de agua desionizada al mismo recipiente. Donde, esta mezcla sustrato más agua desionizada es utilizada en la fase de hidrolisis enzimática.

5.3.2 Secado

Sustratos y reactivos necesarios:

- ✓ Agua desionizada
- ✓ Champiñón Ostra

Equipos Utilizados:

Tabla 4. Equipos Utilizados para Secado.

Equipo	Especificación
Trituración	Batidora de Inmersión Oster
Secado	Estufa de secado de calefacción eléctrica VIMARONI
Balanza	Mettler Toledo PL1502-S

Procedimientos de trabajo y parámetros operacionales:

- Primero se tomaron 100 gramos de champiñón ostra (número elegido como base de cálculo), y se le realizo un troceado fino con cuchillo o símil.
- Se agregaron 25 gramos de este troceado en una placa Petri, habiendo pesado la placa Petri anteriormente.
- El champiñón ostra troceado situado en placa Petri fue limpiado aplicando un flujo continuo de agua desionizada durante un minuto con un colador. Cada limpiado se hizo por separado. (Si hay 100 gramos de champiñón ostra, separar usando 4 placas Petri y realizar 4 limpiados)
- Cada placa Petri con el champiñón ostra troceado se introdujo a la Estufa Vimaroni para llevar a cabo el secado, este secado se ejecutó durante 18 horas continuas y a 50 [°C].

- Posteriormente, las placas Petri con el sustrato fueron pesadas por separado y mantenidas dentro del equipo si no son utilizadas. (Para que no absorban humedad)
- Así, en un recipiente al champiñón ostra ya seco se le añadieron 40 [mL] de agua desionizada aproximadamente y fueron triturados con la batidora Oster durante 1 minuto para obtener una mezcla homogénea para utilizar.
- Se agrego agua desionizada a la zona del triturador que tuvo contacto con el sustrato, esto hasta que haya 50 gramos de mezcla agua desionizada más champiñón en el recipiente, para así no perder sustrato adherido al triturador.
- Esta mezcla de champiñón ostra más agua desionizada fue utilizada en la fase de hidrolisis enzimática.

5.3.3 Secado más Adición de Celulasa

Sustratos y reactivos necesarios:

- ✓ Agua desionizada
- ✓ Champiñón Ostra
- ✓ Carezyme 4500 L

Equipos Utilizados:

Tabla 5. Equipos Utilizados para Secado con Adición de Celulasa.

Equipo	Especificación
Trituración	Batidora de Inmersión Oster
Secado	Estufa de secado de calefacción eléctrica VIMARONI
Balanza	Mettler Toledo PL1502-S

Procedimientos de trabajo y parámetros operacionales:

- Primero se tomaron 100 gramos de champiñón ostra (número elegido como base de cálculo), y se le realizo un troceado fino con cuchillo o símil.
- Se agregaron 25 gramos de este troceado en una placa Petri, habiendo pesado la placa Petri anteriormente.
- El champiñón ostra troceado situado en placa Petri fue limpiado aplicando un flujo continuo de agua desionizada durante un minuto con un colador. Cada limpiado se hizo por separado. (Si hay 100 gramos de champiñón ostra, separar usando 4 placas Petri y realizar 4 limpiados)
- Cada placa Petri con el champiñón ostra troceado se introdujo a la Estufa Vimaroni para llevar a cabo el secado, este secado se ejecutó durante 18 horas continuas y a 50 [°C].
- Posteriormente, las placas Petri con el sustrato fueron pesadas por separado y mantenidas dentro del equipo si no son utilizadas. (Para que no absorban humedad)
- Así, en un recipiente al champiñón ostra ya seco se le añadieron 40 [mL] de agua desionizada aproximadamente y fueron triturados con la batidora Oster durante 1 minuto para obtener una mezcla homogénea para utilizar.

- Se agrego agua desionizada a la zona del triturador que tuvo contacto con el sustrato, esto hasta que haya 50 gramos de mezcla agua desionizada más champiñón en el recipiente, para así no perder sustrato adherido al triturador.
- Instantes previos a la hidrolisis enzimática, se añadieron 579 [μL] de celulasa Carezyme 4500 L diluida con agua desionizada en proporción 1:10.
- Esta mezcla de champiñón ostra más agua desionizada fue utilizada en la fase de hidrolisis enzimática.

5.4 Hidrolisis Enzimática

En la fase de hidrolisis enzimática, como se mencionó previamente se utilizó la mezcla champiñón ostra más agua desionizada, en una relación 1:1, equivaliendo a un total de 50 gramos de mezcla. Donde, al momento de definir el número total de experimentos se consideraron 3 concentraciones distintas de enzima comercial Alcalase para cada pretratamiento, con la adición de una hidrolisis enzimática con pretratamiento sin Alcalase aplicada (Autolisis). Además, a este número se le agregaron hidrolisis enzimáticas sin un pretratamiento previo, siendo estas una autolisis y otra con una concentración de Alcalase agregada de 1,68 [mAU/g_{champiñón}], para estudiar la diferencia en el comportamiento del hidrolizado sin este tipo de procesos, a manera de control.

Así se tendrá el siguiente diseño de experimentos:

Tabla 6. Diseño de Experimentos.

Sigla Exp	Enzimas Comerciales	Pretratamiento Aplicado	Concentración Enzimática		Dosis de Enzima Añadida	
			[mAU/g champ]	[FPU/g quitina]	Proteasa [μL]	Celulasa [μL]
E-1	-	Escaldado	0	0	0	0
E-2	Alcalase	Escaldado	0,42	0	3,9	0
E-3	Alcalase	Escaldado	0,84	0	7,8	0
E-4	Alcalase	Escaldado	1,68	0	15,6	0
S-1	-	Secado	0	0	0	0
S-2	Alcalase	Secado	0,42	0	3,9	0
S-3	Alcalase	Secado	0,84	0	7,8	0
S-4	Alcalase	Secado	1,68	0	15,6	0
SC-1	-	Secado + Celulasa	0	76,72	0	57,9
SC-2	Alcalase + Carezyme	Secado + Celulasa	0,42	76,72	3,9	57,9
SC-3	Alcalase + Carezyme	Secado + Celulasa	0,84	76,72	7,8	57,9
SC-4	Alcalase + Carezyme	Secado + Celulasa	1,68	76,72	15,6	57,9
Ctrl-1	-	Control	0	0	0	0
Ctrl-1	Alcalase	Control	1,68	0	15,6	0

Así, se definieron todos los sustratos y reactivos necesarios, además de selección de equipos, procedimientos de trabajo y parámetros operacionales:

Sustratos y reactivos necesarios:

- ✓ Mezcla champiñón ostra pretratado más agua desionizada razón 1:1
- ✓ Proteasa Alcalase 2,5 L
- ✓ Celulasa Carezyme 4500 L
- ✓ Acido tricloroacético (TCA) al 10% (v/v)

Equipos Utilizados:

Tabla 7. Equipos Utilizados para Escaldado.

Equipo	Especificación
Termorregulador	Thermo Scientific AC200
Rotor	Mettler Toledo G10S
Vástago	
Termocupla	
Centrifuga 1	Labnet Prism C2500
Centrifuga 2	Ortoalresa Digtor 22 C
Balanza	Mettler Toledo PL1502-S

Procedimientos de trabajo y parámetros operacionales:

- Primero, se encendió el termorregulador y se introdujo en un recipiente con agua desionizada para que cumpla con la función de un baño termorregulado. La temperatura seleccionada para trabajar es de 55 [°C].
- Después, se tomaron 50 gramos de champiñón ostra más agua desionizada, ya situados en un recipiente que encaje con el auto titulador Mettler Toledo G10S y se hizo la conexión respectiva para que queden unidos, debido a que este equipo contara con un rotor, vástago agitador y una termocupla para realizar un seguimiento de la agitación como de la temperatura en el recipiente.
- La parte inferior del recipiente se situó dentro del baño termorregulado, esperando a que la temperatura entregada por la termocupla sea de 54 [°C] aproximadamente.
- Mientras el calentamiento de la muestra ocurre, se dejaron preparados 8 tubos Eppendorf de 1,5 [mL], que en su interior poseen 500 [µL] de TCA 10% (v/v) añadidos con una micropipeta.

- Cuando la mezcla llego a la temperatura deseada, se retiraron 500 [μL] de ella y se añadieron a un tubo eppendorf con TCA 10% (v/v) en su interior. Así se obtendrá la cantidad de grupos α-amino previo a la hidrolisis.
- Instantes después, se añadió la cantidad respectiva de enzima (proteasa o proteasa más celulasa).
- Desde ese momento, se realizó un seguimiento de la hidrolisis enzimática durante 60 minutos.
- Se repitió la toma de muestras ocurrida en el instante 0 (previo a añadir enzima). Esta toma de muestra se realizó en los minutos 2, 5, 8, 15, 30, 45 y 60. Para cuantificar posteriormente cantidad de grupos α-amino durante a la hidrolisis.
- Ya terminada la hidrolisis, las muestras tomadas se centrifugaron en la Centrifuga Labnet Prism 2500C durante 10 minutos a 10300 [RPM], donde posteriormente se retiró la fase soluble con uso de una micropipeta, y se traspasó el contenido a otro tubo eppendorf.
- Estas muestras posteriormente se congelaron, para en otro momento cuantificar los grupos α-amino.

Ahora, al realizar la hidrolisis enzimática de proteínas, además de la obtención de muestras para cuantificar **grupos α-amino**, también se pudo obtener su **fase soluble** y la **recuperación de nitrógeno** en el hidrolizado. Para ello, se deberá trabajar con la muestra total hidrolizada obtenida en la misma hidrolisis enzimática.

5.4.1 Fase Soluble

Para obtener este dato, se siguió el procedimiento desde el fin de la hidrolisis enzimática.

- Utilizando la balanza Metler Toledo, se pesó el total de la muestra presente dentro de un tubo Falcon de 50 [mL] (este tubo debe estar pesado por separado).
- Se tomo la muestra total hidrolizada y se centrifugo con la Centrifuga Ortoalresa Digtor 22 C, durante 10 minutos a 4600 [RPM].
- De esta forma, al finalizar la centrifugación existe una fase insoluble y otra soluble presente.
- Se peso por separado la fase soluble presente.
- Posteriormente, congelar esta fase soluble, ya que es necesaria al momento de obtener la recuperación de nitrógeno en la muestra.

Así, para el cálculo de la fase soluble se aplicó la ecuación N°6:

$$F_{soluble}[\%] = \frac{m_{f,sol}[g]}{m_{total,mezcla}[g]} \quad (6)$$

Esto, usando el pesaje de la fase soluble y de la mezcla posterior a la hidrolisis enzimática. Además, es importante considerar que, al momento de calcular el porcentaje de fase soluble, el agua desionizada adicionada en un comienzo corresponde a un gran porcentaje de esta fase soluble, con lo cual no todo este contenido es referido al agua original propio del alimento.

5.4.2 Recuperación de Nitrógeno

Para obtener este dato, se usó el hidrolizado congelado posterior a realizar la separación de la fase soluble. Además, como ya fue explicado con anterioridad, para el cálculo de este parámetro

se requirió tanto del porcentaje de nitrógeno existente en el hidrolizado objetivo como del perteneciente al sustrato original. Utilizando la ecuación N°7:

$$Recuperacion\ de\ nitrogeno\ (RN) = \frac{\%N_{f,sol} * V_{f,sol} [mL] * \rho_{f,sol} \left[\frac{g}{mL} \right]}{\%N_{champ,seco} * muestra [g_{champ,seco}]} \quad (7)$$

Para conseguir estos porcentajes de nitrógeno, se debió realizar el método Kjeldahl, explicado en el “**Anexo A**”, que posee tanto el procedimiento para utilizar los equipos como el cálculo respectivo para saber el porcentaje de nitrógeno existente en la muestra. Mientras que, para el cálculo de la densidad del hidrolizado, se retiraron 5 muestras del hidrolizado con una micropipeta de volumen fijo, fueron pesados en la balanza analítica y se promedió la masa medida, siendo esta densidad igual a 1,021 [g/mL].

5.5 Cuantificación grupos α -amino

En esta fase de la experimentación, ya se obtuvieron las muestras de hidrolizado retiradas cada cierto tiempo en la fase de hidrolisis enzimática, que posteriormente se les aplicó un proceso de congelación para almacenarlas. Así, para lograr la cuantificación de los grupos α -amino del hidrolizado con el pasar del tiempo, se decidió el uso del Método OPA previamente mencionado para cumplir esta tarea.

Ahora, se definieron todos los sustratos y reactivos necesarios, en conjunto con la selección de equipos, procedimientos de trabajo y parámetros operacionales:

Sustratos y reactivos necesarios:

- ✓ Muestras en tubos Eppendorf de 1,5 [mL] obtenidas en la fase de hidrolisis enzimática.
- ✓ Reactivo OPA. (Para su elaboración ver “**Anexo D**”)
- ✓ Agua desionizada.

Equipos Utilizados:

Tabla 8. Equipos Utilizados para Cuantificación de grupos α -amino.

Equipo	Especificación
Espectrofotómetro	Thermo Scientific Orion Aquamate 8000
Celdas de Vidrio	-

Procedimientos de trabajo y parámetros operacionales:

- Primero, se descongelaron las muestras guardadas en los tubos Eppendorf.
- Como siguiente paso se realizó la curva de serina, necesaria para este Método. (Ver “**Anexo E**”)
- La absorbancia leída por el espectrofotómetro se fijó en 340 [nm].
- Después, considerando que es la primera vez realizando el método OPA en estas muestras, se realizó una dilución de la muestra en proporción 1:10; 1:30 y 1:50 en otro tubo Eppendorf. (Esto solo para la muestra retirada en tiempo 0)

- Así, para medir la absorbancia estas diluciones, se agregaron 200 [μL] de la dilución dentro de la celda de vidrio, en conjunto con 1,5 [mL] del reactivo OPA.
- Instantes posteriores, la celda de vidrio se introdujo al espectrofotómetro durante 2 minutos aproximadamente y se leyó la absorbancia de la celda.
- Se realizaron estas mediciones para cada dilución en triplicado.
- Se hizo comparación de estos resultados con la absorbancia obtenida en la curva de serina, si la medición de alguna dilución se mantiene dentro del rango entregado por la serina, utilizar esa dilución como guía para las siguientes muestras de la misma hidrólisis.
- Si con el paso del tiempo en las muestras, la absorbancia se va fuera del rango medido por la curva de serina, se decidió aumentar la dilución de la muestra respecto a la original (en tiempo 0).
- De esta manera, se repitió este procedimiento para todas las muestras de un hidrólisis.

Respecto a la razón de la elaboración de la curva de serina, es porque, al ser la serina un aminoácido conocido, presente en proteínas y de características conocidas, se podrá establecer una relación cuantitativa entre la concentración de serina y la absorbancia entregada por el espectrofotómetro. Y como la serina al ser un aminoácido, este posee solamente un grupo amino y uno carboxilo, con lo cual se llega a la relación que la concentración de serina es igual a la concentración de grupos α-amino. Y de esta manera se pudo relacionar cuantitativamente la absorbancia entregada por las muestras del hidrolizado con respecto a la concentración de grupos α-amino presentes.

Por lo tanto, este es el comportamiento común presente en los puntos de cuantificación de grupos α-amino en el tiempo:

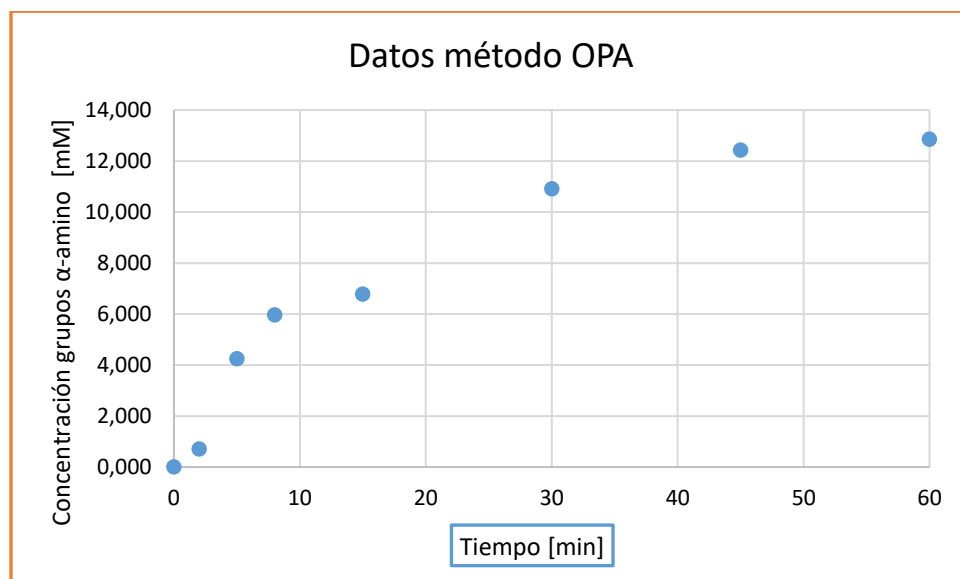


Figura 8. Comportamiento Estándar de cuantificación de grupos alfa amino en el tiempo. (Elaboración propia)

Donde, para obtener esta concentración el tiempo se ocupó la ecuación N°8:

$$Concentracion_{muestra} [mM] = Concentracion_{muestra} [mM]_{(t=t)} - Concentracion_{muestra} [mM]_{(t=0)} \quad (8)$$

Y, para la obtención de la concentración real de grupos α -amino, se siguió la ecuación N°9:

$$Concentraci\acute{o}n_{champ} [mM]_{(t=t)} = Concentraci\acute{o}n_{muestra} [mM]_{(t=t)} * F_{dilucion} * Dilucion_{TCA} \quad (9)$$

Donde, en la ecuación N°9 se consideró tanto la dilución realizada al momento de utilizar el método OPA, como al agregar TCA 10% (v/v) en la fase de hidrólisis enzimática para inactivar las enzimas presentes. De esta manera, se podrá hacer el cálculo del grado de hidrólisis, parámetros empíricos y costo de producción del hidrolizado respecto a la enzima utilizada.

5.5.1 Grado de Hidrólisis

El grado de hidrólisis, corresponde a la cantidad de enlaces peptídicos rotos en la hidrólisis respecto al total de enlaces peptídicos presentes en el sustrato original.

Para este caso, se consideró la ecuación N°1 escrita anteriormente en el estado del arte, en conjunto con la ecuación N°10 planteada por (Benjakul & Morrissey, 1997):

$$Grado\ de\ hidrolisis\ (GH)[\%] = \frac{h}{h_{tot}} * 100 = \frac{L_t - L_0}{L_{max} - L_0} * 100 \quad (10)$$

Siendo L_t y L_0 la concentración de grupos α -amino liberados en el tiempo t e inicial. Mientras que, L_{max} es la concentración de grupos α -amino al realizar un proceso de degradación completa. L_{max} se calculó, utilizando los datos de la digestión completa de champiñón ostra ya realizada, según el método Kjeldahl en el "Anexo A". Teniendo así, la siguientes ecuaciones para el cálculo del grado de hidrólisis:

$$(L_t - L_0) \left[\frac{mmol}{g_p} \right] = \frac{Concentraci\acute{o}n_{champ} \left[\frac{mmol}{L} \right] * V_{fase,sol} [L]}{\%N_{champ,seco} * \left(\frac{g_{prot}}{g_{nitrogeno}} \right) * muestra [g_{champ,seco}]} \quad (11)$$

Donde, la concentración de grupos α -amino fue obtenida en el punto de "Cuantificación de grupos α -amino" y la relación de gramos de proteína referente a gramos de nitrógeno es de 6,58 según (Tshinyangu & Hennebert, 1996). Mientras que, para el cálculo los parámetros L_{max} y L_0 se plantearon las ecuaciones N°12 y N°13:

$$(L_{max}) \left[\frac{mmol}{g_p} \right] = \left(\frac{\left(\%N_{champ,seco} * \frac{1000}{14} \left[\frac{mmol\ N}{g_{nitrogeno}} \right] \right) \left[\frac{mmol\ N}{g_{champ,seco}} \right]}{\left(\%N_{champ,seco} * \left(\frac{g_{prot}}{g_{nitrogeno}} \right) \right) \left[\frac{g_{prot}}{g_{champ,seco}} \right]} \right) = 10,86 \left[\frac{mmol}{g_p} \right] \quad (12)$$

$$(L_0) \left[\frac{\text{mmol}}{g_p} \right] = \left(\frac{(\text{Concentracion}_{\text{muestra}} [\text{mM}]_{(t=0)} * F_{\text{dilucion}} * \text{Dilucion}_{\text{TCA}}) * V_{\text{fase,sol}} [\text{L}]}{\%N_{\text{champ,seco}} * \left(\frac{g_{\text{prot}}}{g_{\text{nitrogeno}}} \right) * \text{muestra} [g_{\text{champ,seco}}]} \right) \quad (13)$$

Obteniendo así, la ecuación para el cálculo del grado de hidrolisis:

$$GH[\%] = \frac{\left(\frac{\text{Concentracion}_{\text{champ}} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right] * V_{\text{fase,sol}} [\text{L}]}{\%N_{\text{champ,seco}} * \left(\frac{g_{\text{prot}}}{g_{\text{nitrogeno}}} \right) * \text{muestra} [g_{\text{champ,seco}}]} \right)}{10,86 - \frac{(\text{Concentracion}_{\text{muestra}} [\text{mM}]_{(t=0)} * F_{\text{dilucion}} * \text{Dilucion}_{\text{TCA}}) * V_{\text{fase,sol}} [\text{L}]}{\%N_{\text{champ,seco}} * \left(\frac{g_{\text{prot}}}{g_{\text{nitrogeno}}} \right) * \text{muestra} [g_{\text{champ,seco}}]}} \quad (14)$$

5.5.2 Parámetros Empíricos Asociados a la hidrolisis enzimática

Como fue mencionado con anterioridad, para el cálculo de los parámetros empíricos asociados a la hidrolisis enzimática, previamente se requerirá de los puntos de cuantificación de los grupos α -amino respecto al tiempo. Donde se usó la ecuación N°4 para modelar los datos en curvas de cuantificación de los grupos α -amino:

$$P(t) = \frac{1}{b} * \ln(a * b * t + 1) \quad (4)$$

Siendo P(t), la concentración total de los grupos α -amino del hidrolizado respecto al tiempo, y t la variable temporal.

Así, para conseguir que la curva se acople a los datos se decidió usar el método de los mínimos cuadrados (MMC), donde se busca que los residuos obtenidos entre la diferencia del modelo y los datos experimentales sea mínima. Para esto, se variaron los parámetros “a” y “b”, hasta conseguir un resultado que minimice este error cuadrático:

$$\text{Suma Residuos Cuadrado} = \sum (P_e - P_M)^2 \quad (15)$$

Siendo P_e, el producto experimental y P_M el producto según el modelo buscado.

De esta manera, existen parámetros ajustados “a” y “b” para cada hidrolisis con cierto pretratamiento y concentración de proteasa agregada. Así, se realizó un cálculo del coeficiente de determinación R² y el error estándar (SE) para caracterizar que tan bien se ajustan estos parámetros al set de experimentos.

Ahora, para el cálculo de coeficiente de determinación R² sobre la curva de cuantificación de grupos α -amino. Se debe saber previamente que este valor ronda entre 0 y 1, y mientras más cercano este valor sea a 1, mayor es el acople de los datos experimentales respecto a la curva modelada. Para esto, se usó la siguiente ecuación:

$$R^2 = 1 - \frac{VAR}{VAT} \quad (16)$$

Siendo VAR la varianza residual y VAT la varianza total, que son expresados de la siguiente manera:

$$VAR = \sum_{i=1}^n (y_{dato} - y_{modelo})^2 \quad (17)$$

$$VAT = \sum_{i=1}^n (y_{dato} - y_{prom,dato})^2 \quad (18)$$

Siendo y_{dato} , y_{modelo} e $y_{prom,dato}$, la concentración de grupos α -amino, la obtenida por la curva modelo y el promedio de los datos reales respectivamente. Por otro lado, n es el número de datos tomados por hidrolisis.

Mientras que, para el error estándar se utilizó la ecuación N°19 (Valencia et al., 2015):

$$Error\ estandar(SE) = \sqrt{MSE * C_{jj}} \quad (19)$$

Siendo MSE, el error cuadrático medio y C_{jj} el elemento situado en la fila y columna j de la matriz de dispersión $(X^T X)^{-1}$. Así, se hizo el cálculo del MSE al usar la ecuación N°21:

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (y_{dato} - y_{modelo})^2}{n - k} \quad (20)$$

Donde n y k, son respectivamente el número de datos considerados y el número de parámetros que posee la ecuación del modelo.

Y, para verificar si los parámetros “a” y “b” de cada hidrolisis son significativos para su regresión, se utilizó la prueba de significancia de parámetros.

- Prueba de significancia

Esta prueba de significancia busca estudiar si, el número de parámetros definidos inicialmente son correctos para que el comportamiento del modelo se acople estrechamente a los datos experimentales, o que, exista un sobredimensionamiento de estos, teniendo así parámetros insignificantes presentes para esa hidrolisis en específico.

Para ello, se plantearon las siguientes hipótesis:

$$H_0: \beta_i = 0 \quad (21)$$

$$H_1: \beta_i \neq 0 \quad (22)$$

De esta manera, si la hipótesis nula (H_0) no es rechazada, se tiene que el parámetro estudiado no es significativo respecto al modelo de la hidrólisis en específico. Por otro lado, si la hipótesis nula es rechazada, el parámetro estudiado es de importancia al modelo de la hidrólisis en específico.

Ahora, para saber si se rechaza o no la hipótesis nula se utilizaron las ecuaciones N°23 y N°24:

$$t_0 = \frac{\beta_i}{Error\ Estandar(\beta_i)} \quad (23)$$

$$t_{student} = t_{\left(\frac{\alpha}{2}, n-p\right)} = t_{(0,05,8-2)} = 2,45 \quad (24)$$

Así, si $t_0 < t_{student}$ la hipótesis nula no será rechazada, teniendo que el parámetro no es significativo. Mientras que, si $t_0 > t_{student}$ el parámetro es de importancia al modelo de la hidrólisis en específico. Los resultados de esta prueba de significancia de parámetros pueden ser vistos en el “**Anexo F**”.

5.5.3 Costes Asociados

Ahora, desde el ámbito económico se realizó una comparación de la cantidad de proteína extraída desde el sustrato original, respecto a la cantidad de proteasa aplicada. Además de agregar otro parámetro relacionado al costo de la enzima necesaria para extraer cierta cantidad de proteína dentro del hidrolizado. Para ello, primero se requirió saber el coste de cada enzima, datos que se encuentran mostrados en la Tabla N°9:

Tabla 9. Costos de Enzimas Comerciales Utilizadas.

Nombre Comercial	Costo [USD/kg]
Carezyme 4500 L	16,08
Alcalase 2,5 L	16,08

Cabe destacar que, el coste de la proteasa Alcalase 2,5 L es fija a cotizaciones obtenidas al realizar contacto con el proveedor de este producto en el país respectivo, mientras que, frente a la falta del coste de la celulosa Carezyme 4500 L, se supuso que su coste sea igual a la de la proteasa.

De esta manera, al ya saber estos costes se utilizó la ecuación N° 25 para calcular el coste de gramo de proteína extraída por gramo de enzima adicionada:

$$Costo_{enz,H} \left[\frac{g_{prot}}{g_{enz}} \right] = \frac{\left(V_{f,sol} [mL] * \rho_{f,sol} \left[\frac{g}{mL} \right] * \%N_{f,sol} * \left(\frac{g_{prot}}{g_{nitrogeno}} \right) \right)}{Dosis_{enz} [g_{enz}]} \quad (25)$$

Este parámetro vario dependiendo de la dosis de proteasa Alcalase aplicada para las diferentes hidrolisis, como también al añadir celulasa Carezyme como pretratamiento.

Ahora, al estudiar el costo de las enzimas adicionadas requeridas para extraer un kilogramo de proteína, se usó la ecuación N° 26:

$$Costo_{enz,H} \left[\frac{USD}{kg_{prot}} \right] = \frac{Dosis_{Alc} [g_{alc}] * Costo_{alc} \left[\frac{USD}{g_{alc}} \right] + Dosis_{Care} [g_{Care}] * Costo_{Care} \left[\frac{USD}{g_{Care}} \right]}{\left(V_{f,sol} [mL] * \rho_{f,sol} \left[\frac{g}{mL} \right] * \%N_{f,sol} * \left(\frac{g_{prot}}{g_{nitrogeno}} \right) \right)} * 10^3 \quad (26)$$

Cabe mencionar que, tanto las dosis de enzima añadidas y la cantidad de proteína extraída presente en el hidrolizado son datos ya calculados en este punto de la obtención de resultados.

Además, se realizó una comparación del coste de obtener este hidrolizado frente al coste de adquisición de este tipo de hidrolizados proteicos en el comercio. Y así, dimensionar si existe actualmente la posibilidad de manufacturar este producto. Para esto, la ecuación del coste total se definió de la siguiente forma:

$$Costo_{total,H} \left[\frac{USD}{kg_{prot}} \right] = \left(Costo_{enz,H} + \frac{Costo_{cultivo}}{RN} + Costo_{secado} \right) \left[\frac{USD}{kg_{prot}} \right] \quad (27)$$

Donde se hizo alusión al coste de las enzimas adicionadas, más el costo de realizar el cultivo del hongo *Pleurotus Ostreatus* y el secado necesario en ciertos pretratamientos como el secado de este líquido proteico para la obtención de un polvo de fácil consumo.

De esta manera, para el costo relacionado del cultivo, este se situó en 0,75 [USD] (703 CLP) por kilogramo de champiñón ostra cultivado (Chitra et al., 2018), que equivaldría a 36,59 [USD] (34300 CLP) por kilogramo de proteína presente en el sustrato. Y, este valor fue dividido por la recuperación de nitrógeno de cada hidrolisis, para obtener el costo de cultivación por kilogramo de proteína extraída del sustrato. Mientras que, para el costo del secado como pretratamiento se supuso una potencia de 1,6 kW en la estufa, que se encontró encendida durante 18 horas para obtener la humedad objetivo, teniendo en cuenta que el llenado de la estufa con sustrato da abasto a poder producir 1 kilogramo de proteína de *Pleurotus Ostreatus*, teniendo así un consumo de 28,8 kW-h por kilogramo de hidrolizado secado. Y, para el secado del hidrolizado se ocupó un secador spray que tiene un consumo energético de 2,05 kW-h por kilogramo de hidrolizado secado, siendo este valor proveniente de simulaciones con suero de leche como materia prima (Domínguez-Niño et al., 2018). Teniendo así, un gasto respectivo de 7,02 [USD] y 0,5 [USD] por kilogramo de hidrolizado secado, esto considerando que se tomó en cuenta el coste de energía de Chile para realizar esta conversión.

5.5.4 Prueba de Diferencias Significativas

Así, se aplicaron diferentes técnicas estadísticas en los datos obtenidos para identificar si los valores correspondientes en cada situación poseían diferencias significativas entre ellas. El procedimiento de actuar es similar al presente en la “Prueba de Significancia” en la sección “5.5.2”, estas pruebas siendo:

- Test de Anova

El Test de Anova se utilizó para reconocer si existió una diferencia significativa reconocible entre un cierto grupo de muestras. Para ello, el procedimiento realizado al igual que la “Prueba de Significancia” en la sección “5.5.2”, se planteó la Hipótesis 0 en conjunto con la Hipótesis 1, que dice lo siguiente:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_n \quad (28)$$

$$H_1: \text{Los promedios no son todos iguales} \quad (29)$$

Siendo μ_x el promedio de cada dato. Teniendo que, si se rechaza la Hipótesis 0, se tiene que los promedios de los datos no son todos iguales, evidenciando una diferencia significativa como mínimo en uno de los datos seleccionados respecto al resto.

Para evidenciar esta diferencia se calculó la variable estadística de Fisher o valor F, con la ecuación N°30:

$$F = \frac{\frac{(\sum_{j=1}^n (\bar{X}_j - \bar{X}))^2}{k - 1}}{\frac{\sum_{j=1}^k \sum_{l=1}^n (X_l - \bar{X}_j)^2}{N - k}} \quad (30)$$

Siendo \bar{X}_j , \bar{X} y X_l respectivamente el promedio de datos de cierto grupo, el promedio total de datos y un cierto dato de la totalidad de las muestras. Mientras que, N y k son el número total de datos y el número de grupos totales.

Así, ya con la variable calculada esta se comparó con el valor de F crítico provenientes de tablas de distribución de Fisher ya definidas. De esta manera, si el valor calculado es mayor al F crítico, se tiene que existirá una diferencia significativa como mínimo en uno de los datos seleccionados respecto al resto. Por otro lado, si el F calculado es menor al F crítico no se rechazará la Hipótesis 0.

- Test de Tukey

El test de Tukey se utilizó en conjunto con el Test de Anova, ya que, este test estadístico es capaz de identificar si existe una diferencia significativa entre distintos grupos procedentes de una muestra total. Estas dos pruebas se utilizaron en conjunto para saber si existe tanto una diferencia significativa en los datos presentes y cuales grupos son significativamente diferentes entre sí.

Para ello, se utilizó la ecuación N°31:

$$HSD = q * \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})^2}{r}} \quad (31)$$

Siendo HSD, la diferencia honestamente significativa. Mientras que, q y r respectivamente son el valor critico proveniente de la tabla de Tukey y la cantidad de replicas de cada dato. Además, X_i y \bar{X} son el dato cualquiera de un grupo y el valor promedio del mismo grupo a comparar. Ahora, la diferencia honestamente significativa se comparó con la diferencia absoluta entre los 2 grupos a comparar. Si el valor HSD es mayor a la diferencia absoluta entre los grupos, se tiene que no existirán diferencias significativas entre los grupos, por otro lado, si el valor HSD es menor, existe una diferencia significativa entre los grupos.

6. Resultados y Discusión

6.1 Caracterización del Hidrolizado

6.1.1 Fase Soluble

En la Figura N°9 se observa el porcentaje de fase soluble del hidrolizado utilizando cada pretratamiento por separado, adicionando los resultados pertenecientes al control. Esto considerando, que para cada pretratamiento se varió la concentración de Alcalase adicionada, siendo esta 0 [mAU/g_{champ}]; 0,42 [mAU/g_{champ}]; 0,84 [mAU/g_{champ}] y 1,68 [mAU/g_{champ}] respectivamente. Asimismo, las condiciones de operación de estos experimentos son los referenciados en la fase metodológica, realizando todas las hidrolisis en un reactor por lotes durante 60 minutos, con pH nativo, a 55 [°C] y con sustrato en dilución 50% (p/p). Teniendo así la Figura N°9:

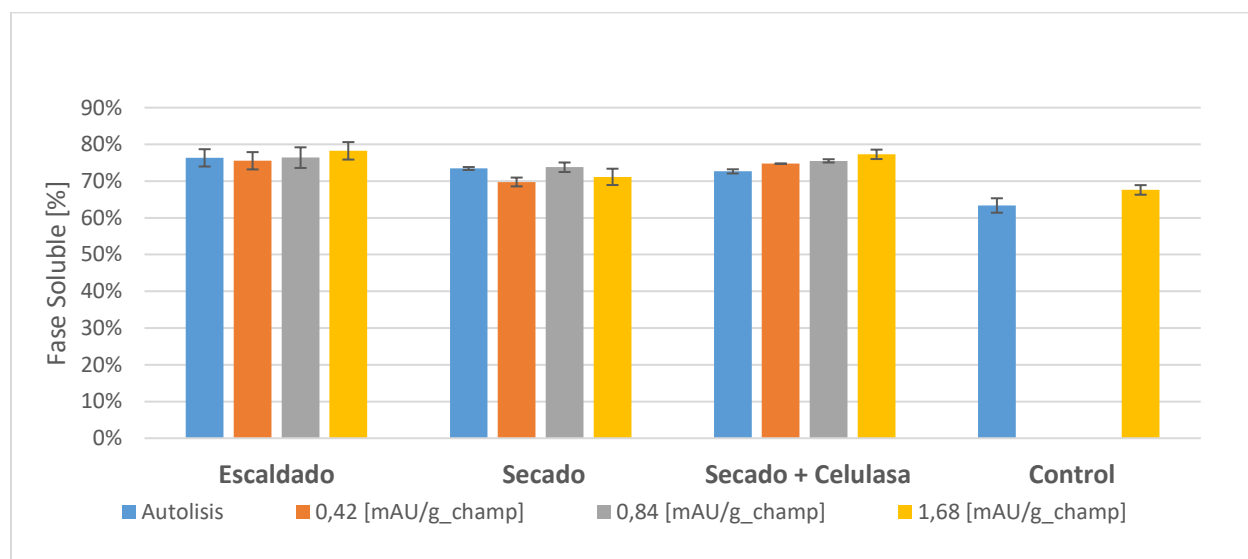


Figura 9. Fase Soluble del Hidrolizado para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción, pH nativo, a 55 [°C] con sustrato en dilución 50% (p/p). Considerando Concentraciones de Alcalase 0 [mAU/g_{champ}] (Autolisis); 0,42 [mAU/g_{champ}]; 0,84 [mAU/g_{champ}]; 1,68 [mAU/g_{champ}].

Así, como es visto en el “Anexo G”, se realizó un análisis de diferencias significativas entre las fases solubles agrupadas según el tipo de pretratamiento utilizado, observándose que, al aplicar secado más adición de celulasa se identificó la presencia de diferencias significativas entre las fases solubles obtenidas al variar la concentración de enzima añadida. Esta diferencia puede ser atribuida al mínimo error presente en las cuantificaciones de la fase soluble.

También, el porcentaje de fase soluble del control es menor que realizando un pretratamiento al sustrato, teniendo respectivamente una fase soluble de 63,4±1,24% y 67,6±0,88% para la autolisis y con una dosis de proteasa adicionada de 1,68 [mAU/g_{champ}], esto podría ser debido a que tanto pared celular como la estructura del sustrato no poseen ningún tipo de deformación realizada en el control, causando así que exista una mayor resistencia a separar la fase líquida presente dentro de la célula. Mientras que, no existe una diferencia significativa al agregar proteasa adicional o no.

Cabe destacar que, estos porcentajes de la fase soluble del hidrolizado son tan altos debido a que al utilizar una mezcla de agua desionizada más sustrato en relación 1:1 (p/p) para la hidrólisis, se tuvo que al centrifugar el hidrolizado un gran contenido de la fase soluble corresponde al agua desionizada adicionada en un inicio.

6.1.2 Recuperación de Nitrógeno

Para conocer el porcentaje de recuperación de Nitrógeno respecto al original en el sustrato, se tiene la Figura N°10:

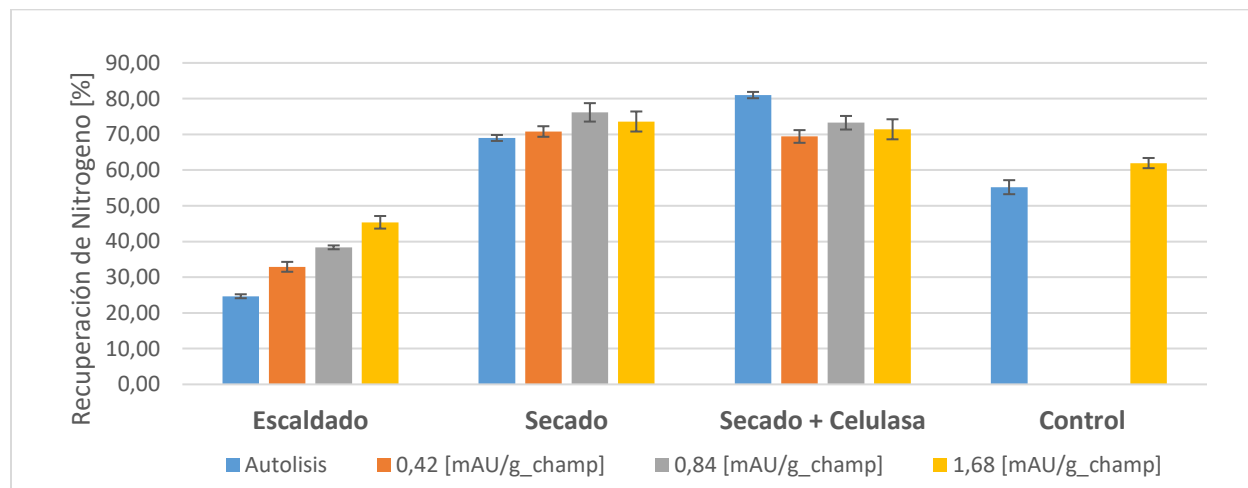


Figura 10. Recuperación de Nitrógeno del Hidrolizado para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase 0 [mAU/ g_{champ}] (Autolisis); 0,42 [mAU/ g_{champ}]; 0,84 [mAU/ g_{champ}]; 1,68 [mAU/ g_{champ}].

Al enfocarse en el escaldado como pretratamiento se observó que, existe una diferencia significativa entre cada valor de la recuperación de nitrógeno, como es visto en el “Anexo H”, teniendo que, a mayor cantidad de concentración de proteasa adicionada, mayor es la recuperación de nitrógeno del hidrolizado, teniendo que esta variable va desde una recuperación de nitrógeno de 24,67±0,55% hasta un 45,38±1,76%. Este comportamiento podrá ser causado debido a que, al realizar el tratamiento térmico ocurrió una inactivación térmica significativa de las proteasas propias del alimento, evitando que estas proteasas del sustrato inicial reduzcan el largo de estas proteínas y que ocurra un aumento de la solubilidad de las proteínas para que sean almacenadas dentro de la fase soluble del hidrolizado posterior a la centrifugación, dando total responsabilidad a la proteasa comercial adicionada a realizar esta función.

Ahora, respecto a la recuperaciones de nitrógeno al aplicar secado y secado más adición de celulasa como pretratamientos, como se observo en la Figura N°10 no existe una diferencia significativa presente entre cada pretratamiento, teniendo así que la adición de celulasa en este proceso de hidrólisis no posee un efecto significativo para la recuperación de nitrógeno con los parámetros de operación seleccionados en la fase metodológica. Además, se observó que no existe una diferencia significativa al utilizar secado como pretratamiento, para cualquier concentración de proteasa elegida.

El mayor porcentaje de nitrógeno recuperado lo poseerán los pretratamientos de secado y secado más celulasa. Esta diferencia entre el utilizar escaldado y los otros dos pretratamientos

podría ser debido que, al realizar el escaldado, el agua a temperatura elevada absorba cierta cantidad de las proteínas propias del alimento que originalmente hayan tenido un grado de solubilidad lo suficientemente alto para que puedan ser transportadas al agua a esa temperatura en específico, reduciendo así el total de proteínas disponibles en la mezcla de champiñón más agua desionizada previa a la hidrólisis.

Por otro lado, respecto al control su recuperación de nitrógeno fue de $55,21 \pm 1,96\%$ y $61,96 \pm 1,37\%$ para la autólisis y al agregar una dosis de proteasa de $1,68 \text{ [mAU/g}_{\text{champ}}]$. Siendo estos valores mayores a los observados al seleccionar escaldado como pretratamiento bajo cualquier dosis de proteasa agregada, esta diferencia puede ser justificada por la cantidad significativa de proteína que se retira del sustrato al realizar el escaldado.

6.1.3 Grado de Hidrólisis

Respecto al grado de hidrólisis, se tiene la Figura N°11:

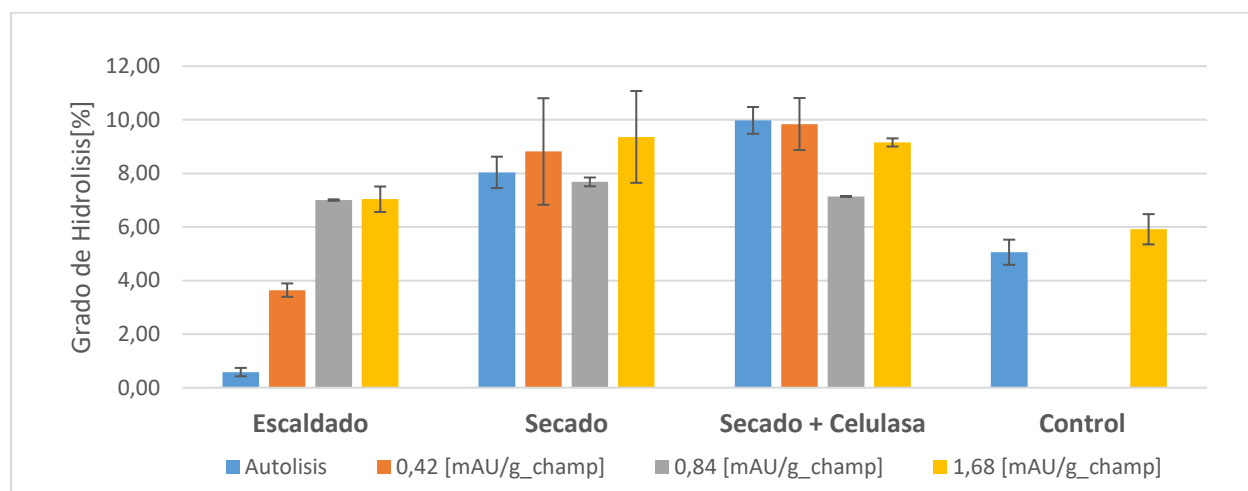


Figura 11. Grado de Hidrólisis del Hidrolizado para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase $0 \text{ [mAU/g}_{\text{champ}}]$ (Autólisis); $0,42 \text{ [mAU/g}_{\text{champ}}]$; $0,84 \text{ [mAU/g}_{\text{champ}}]$; $1,68 \text{ [mAU/g}_{\text{champ}}]$.

Primero, al enfocarse en las hidrólisis donde se hizo escaldado como pretratamiento, al igual que para los resultados de recuperación de Nitrógeno, existen diferencias significativas entre sus resultados al variar la concentración de proteasa, teniendo un aumento gradual en la variable estudiada al momento de adicionar proteasa en las cantidades especificadas, llegando a un rango máximo cuando la concentración de enzima es de $0,84 \text{ [mAU/g}_{\text{champ}}]$, siendo este grado de hidrólisis igual a $7,00 \pm 0,28\%$.

Mientras que, cuando se utilizó secado no existió una diferencia significativa en el grado de hidrólisis al agregar proteasa, donde esta variable va de $7,68 \pm 0,16\%$ hasta un máximo de $9,36 \pm 1,71\%$. Lo mismo es dicho cuando se usó como pretratamiento secado más celulasa, ya que, su grado de hidrólisis va de $7,14 \pm 0,03\%$ hasta un máximo de $9,98 \pm 0,5\%$.

Además, se vio que incluso el control obtuvo un grado de hidrólisis mayor al ser comparado con mediciones realizadas a hidrólisis con escaldado aplicado. Este efecto podría ser explicado, ya que, al aplicar el escaldado no quedarán proteasas propias del alimento que rompan las

proteínas en la duración de la hidrólisis, dependiendo mayoritariamente de la enzima comercial Alcalase añadida, diferenciándose completamente de los otros pretratamientos estudiados.

Asimismo, se realizó una comparación con resultados de hidrólisis enzimática aplicadas en subproductos de *Agaricus Bisporus* (champiñón común) con un secado previo, donde se tuvo un grado de hidrólisis de $23,7 \pm 0,5\%$. Esta diferencia, radicaría en que se usó una temperatura de operación de $50 [^{\circ}\text{C}]$ durante un periodo de 2 horas, con una relación de enzima/sustrato igual a $0,3\%$, dando así margen a que en este estudio sea mayor el grado de hidrólisis. Mientras que, al comparar con hidrólisis enzimáticas realizadas a esquelón de salmón, se tuvo un grado de hidrólisis aproximado de 6% al trabajar a una temperatura de $55 [^{\circ}\text{C}]$, pH nativo, sustrato en relación 50% (p/p) con dosis de enzima comercial de Alcalase adicionada (Valencia et al., 2021), siendo estas condiciones de operación extremadamente similares a las trabajadas en este estudio, con grados de hidrólisis cercanos a los obtenidos experimentalmente.

6.2 Curvas de grupos α -amino y parámetros del modelo logarítmico

6.2.1 Cuantificación de grupos α -amino en la hidrólisis enzimática

Ahora, se estudiaron las diferencias existentes en los puntos de cuantificación de grupos α -amino del experimento en sí, para después presentar los parámetros “a” y “b” propios de la ecuación logarítmica N°6, esto para cada situación estudiada y así comparar los datos obtenidos.

En las Figuras N°12, N°13, N°14 y N°15 se observan graficadas las concentraciones de grupos α -amino:

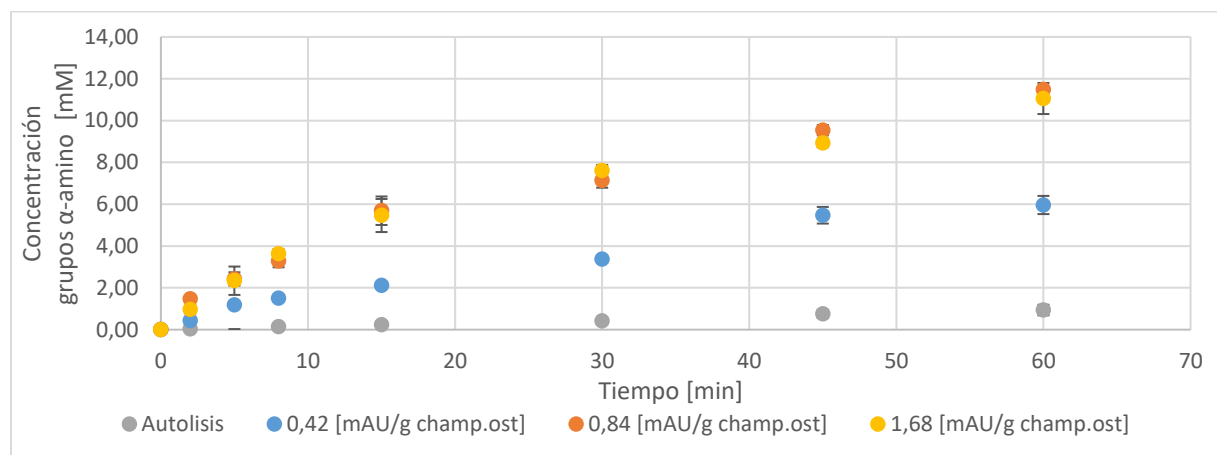


Figura 12. Concentración grupos α -amino Usando Escaldado como Pretratamiento a diferentes concentraciones de enzima adicionada, a una temperatura de 55°C , 50% (w/w) y pH nativo.

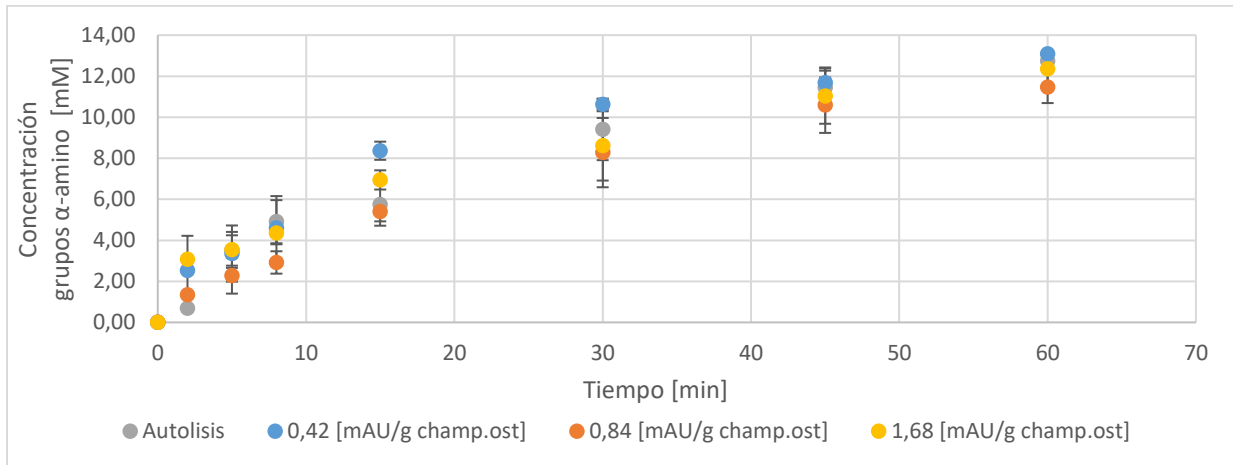


Figura 13. Concentración grupos α -amino Usando Secado como Pretratamiento a diferentes concentraciones de enzima adicionada, a una temperatura de 55°C, 50% (w/w) y pH nativo.

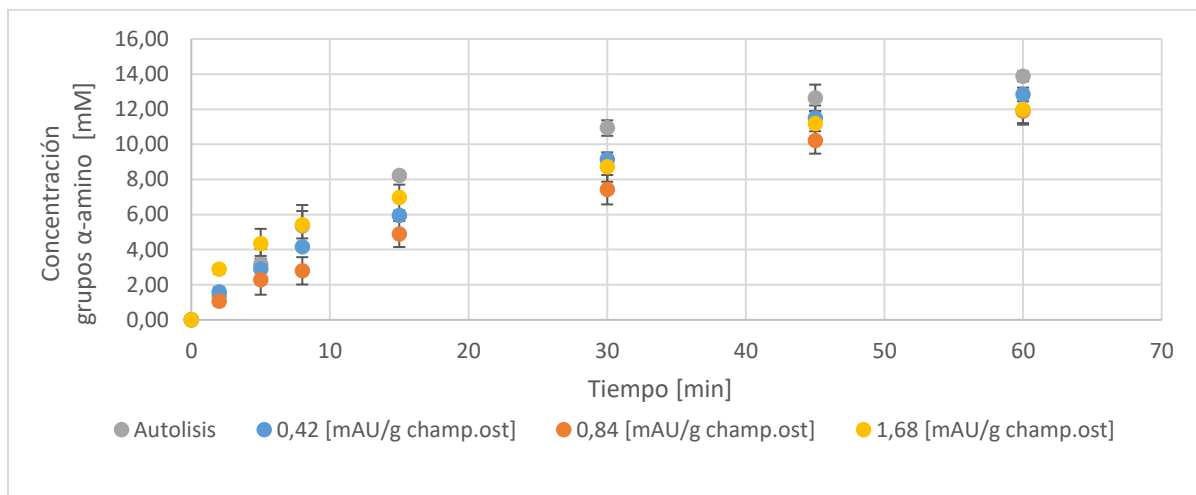


Figura 14. Concentración grupos α -amino Usando Secado + Celulasa como Pretratamiento a diferentes concentraciones de adicionada, a una temperatura de 55°C, 50% (w/w) y pH nativo.

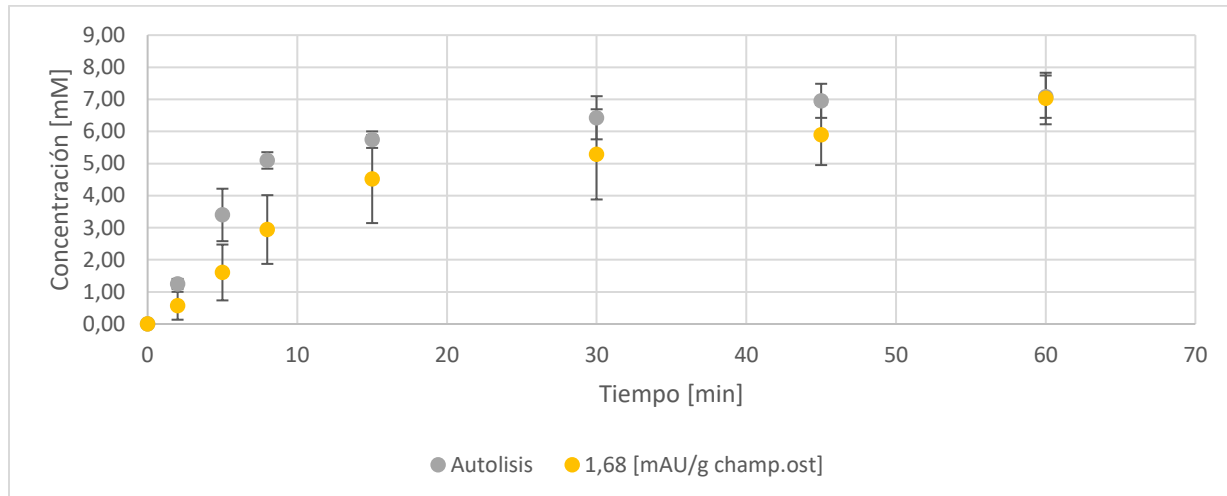


Figura 15. Concentración grupos α -amino en Control a diferentes concentraciones de enzima adicionada, a una temperatura de 55°C, 50% (w/w) y pH nativo.

Al observar la Figura N°12, se realizó un proceso de hidrólisis sobre la mezcla que previamente fue tratada con escaldado. Se observó que al no adicionar proteasa sobre la mezcla, el aumento de la concentración de grupos α -amino con el transcurrir del tiempo es pequeña, llegando a ser de $0,94 \pm 0,25\%$ al pasar los 60 minutos de reacción. Mientras que, al añadir proteasa se tuvo un aumento notable de la concentración de grupos α -amino presente. Ahora, al añadir 0,42 y 0,84 [mAU/g_{champ}] de proteasa al comenzar la hidrólisis, se tuvo que la concentración de grupos α -amino creció de manera proporcional, sin embargo al añadir 1,68 [mAU/g_{champ}] de proteasa, no existió una diferencia significativa en su concentración de grupos α -amino respecto al experimento con una concentración de 0,84 [mAU/g_{champ}], esto podrá ser debido a una saturación de los sitios de ruptura presentes en la superficie de las partículas de champiñón ostra, causando así que al seguir aumentando la dosis de enzima añadida no varíe con concentración de grupos α -amino. Estas observaciones se corroboraron mediante el análisis estadístico de diferencias significativas presente en el “Anexo G” y “Anexo H”.

Mientras que, respecto a las Figuras N°13 y N°14, no se observó una diferencia significativa entre ocupar secado o secado más adición de celulosa como pretratamiento. Lo mismo es ser dicho al variar la concentración de proteasa en estos pretratamientos. Esto podrá ser debido a que, la cantidad de enzimas propias del mismo alimento son suficientes para ocupar la totalidad de los sitios de ruptura presentes en la superficie de las partículas de champiñón ostra. Ahora, la diferencia de resultados entre utilizar escaldado o los otros 2 pretratamientos radica en que, al aplicar temperaturas mayores a 90 [°C] en el escaldado, se generó una inactivación térmica de las enzimas propias del champiñón ostra, teniendo que para ese pretratamiento en específico es crucial la adición de proteasa para que aumente la concentración de grupos α -amino.

En la Figura N°15 no se observó una diferencia significativa en la concentración de grupos α -amino a lo largo de la reacción para el caso del caso control. Pero, a diferencia de cuando se realizó un pretratamiento al sustrato, la concentración de grupos α -amino alcanzados al fin de la reacción es menor llegando a un promedio de 7 [mM], a diferencia de los 13 [mM] promedio en los resultados previos. Esta diferencia podrá ser debido a que al no causar una alteración en la pared celular del hongo, la interacción entre las proteínas presentes dentro de la célula y las enzimas fuera de la célula fue ínfima, teniendo así que solamente se cuantificaron los grupos α -amino de las proteínas presentes fuera de la célula.

6.2.2 Parametros del modelo logaritmico

Ahora, respecto a los parametros "a", "b" y R² obtenidos al realizar la curva de concentracion de grupos α-amino respecto al tiempo para cada hidrolisis, se tuvieron los siguientes resultados en la Tabla N°10.

Tabla 10. Parámetros "a" [mM/min], "b"[1/mM] y R² del modelo logarítmico para cada Hidrolisis, a una temperatura de 55 [°C] y 60 [min] de tiempo de reacción.

ID	a [mM/min]	Error Standard	b [1/mM]	Error Standard	R2
E-1	0,0156	0,0026	0,0001	0,4190	0,9795
E-2	0,1860	0,0293	0,1849	0,0552	0,9842
E-3	0,4447	0,0637	0,1400	0,0328	0,9889
E-4	0,6203	0,0588	0,2005	0,0177	0,9953
S-1	0,8020	0,1156	0,1765	0,0223	0,9895
S-2	2,6406	0,5093	0,2989	0,0163	0,9856
S-3	0,5445	0,0453	0,1516	0,0143	0,9961
S-4	1,1559	0,2359	0,2396	0,0326	0,9832
SC-1	1,0742	0,1194	0,1784	0,0153	0,9942
SC-2	0,8840	0,0859	0,2009	0,0140	0,9950
SC-3	0,4340	0,0306	0,1202	0,0124	0,9967
SC-4	1,6894	0,2660	0,2928	0,0250	0,9901
Ctrl-1	2,2417	0,9201	0,5759	0,0950	0,9570
Ctrl-2	0,6162	0,1325	0,3979	0,0597	0,9798

Al comparar con los parametros calculados por (Camus, 2023) y (Valencia et al., 2021), se observo que el parametro "a" fue menor respecto al parametro calculado al realizar hidrolisis sobre esquelon de salmon, mientras que en el caso del parametro "b", este fue mayor. Esta variacion significativa en los valores de los parametros es una consecuencia directa de la diferencia del contenido de proteina en cada sustrato, ya que, el contenido de proteina de champiñon ostra es aproximadamente 10 veces menor al de esquelon de salmon, resultando en que la concentracion de grupos α-amino final se redujo significativamente respecto a cuando se utilizo esquelon de salmon. Teniendo asi, que la velocidad inicial de reaccion (parametro "a") es mucho menor debido a la menor presencia de sustrato presente y el parametro "b" es mayor debido a la rapida desaceleracion de formacion de producto por una probable saturacion de la reaccion o por el dificil acceso de la enzima sobre las proteinas dentro de la celula.

6.3 Costes Asociados en Producción del Hidrolizado Procesado

Así, para la sección de costes asociados se observaron las Figuras N°16, N°17 y N°18:

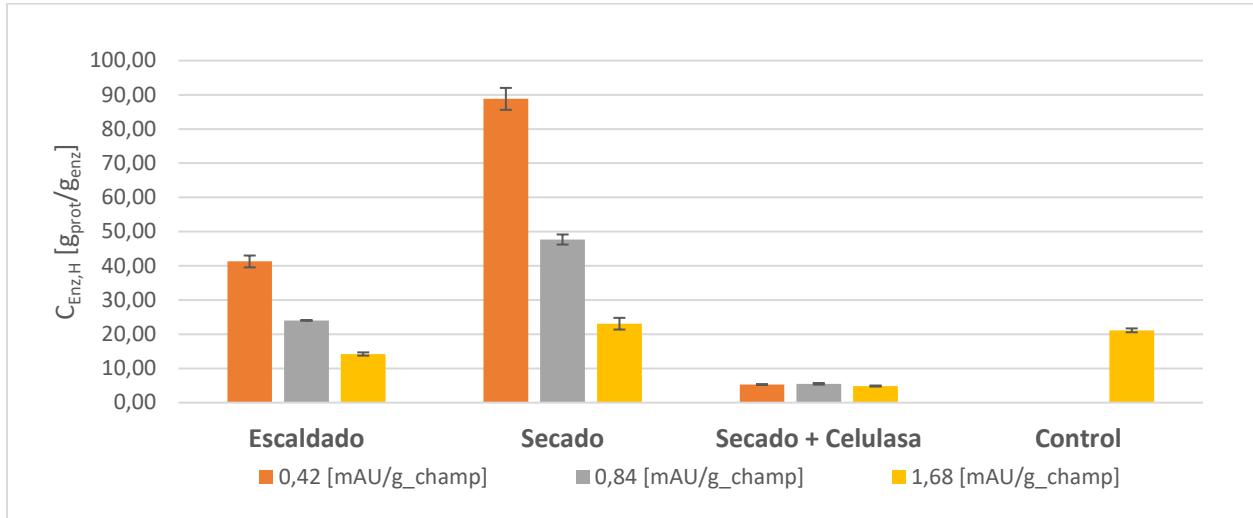


Figura 16. Proteína extraída por gramo de enzima utilizada. Esto para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase de 0,42 [mAU/ g_{champ}]; 0,84 [mAU/ g_{champ}]; 1,68 [mAU/ g_{champ}].

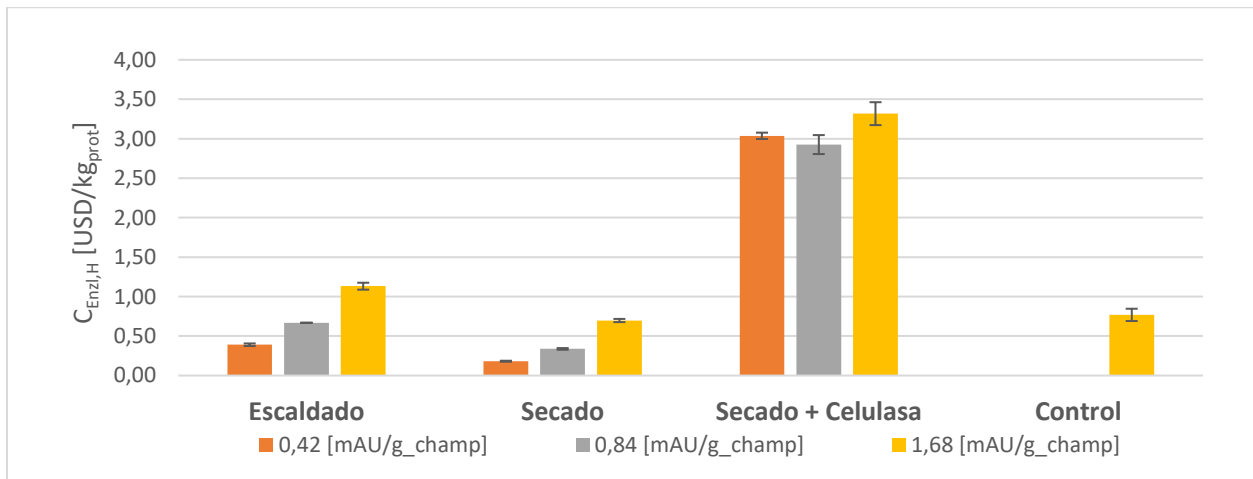


Figura 17. Coste de enzimas utilizadas para extraer un kilogramo de proteína. Esto para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase de 0,42 [mAU/ g_{champ}]; 0,84 [mAU/ g_{champ}]; 1,68 [mAU/ g_{champ}].

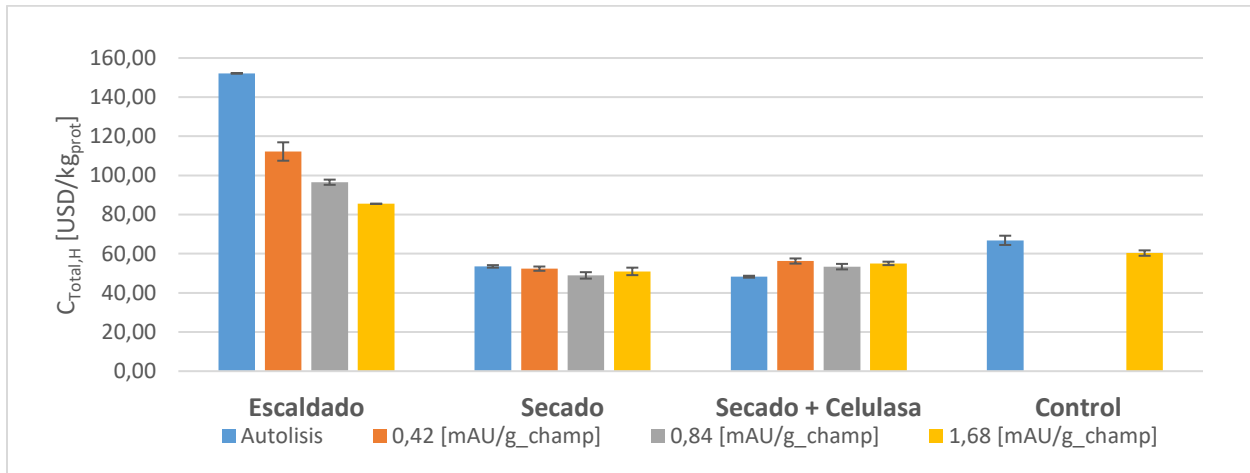


Figura 18. Coste total considerado para obtener un kilogramo de proteína de Champiñón Ostra. Esto para cada pretratamiento aplicado con 60 minutos de reacción. Considerando Concentraciones de Alcalase de 0; 0,42 [mAU/g_{champ}]; 0,84 [mAU/g_{champ}]; 1,68 [mAU/g_{champ}].

Ahora, respecto a los costes referentes a la utilización de enzimas proteolíticas o celulíticas, si lo buscado es optimizar el gasto de enzimas comerciales añadidas, lo recomendable es trabajar las hidrolisis con una concentración enzimática de proteasa de 0,42 [mAU/g_{champ}], debido a que los datos experimentales denotan que la razón de proteína extraída respecto a enzima consumida fue mayor para estos casos, especialmente al utilizar secado como pretratamiento, que tiene un valor igual a 88,81±3,21 [g_{prot}/g_{enz}]. Y, se tuvo que al escoger el secado más celulasa como pretratamiento estos valores serán los menores, debido a que también se contabilizo la cantidad de celulasa añadida.

Asimismo, al cuantificar la cantidad de dinero gastada en enzimas proteolíticas o celulíticas respecto a la producción de un kilogramo de proteína de *Pleurotus Ostreatus*. Se observo que estos valores no superaran los 4 [USD] aun en el peor de los casos, apreciándose así, que el gasto neto centrado en enzimas no fue significativamente alto. Denotando que, nuevamente al utilizar secado estos valores son los menores entre las demás opciones estudiadas, siendo menor a 1 [USD].

Por otro lado, realizando énfasis en la Figura N°18, se tiene que el costo total para producir un kilogramo de proteína es considerablemente elevado, siendo el factor principal de esto, el alto costo total de cultivación de estos hongos para producir el producto objetivo. Esto es principalmente causado por el bajo contenido proteico propio de los hongos, teniendo así la necesidad de cultivar más de 50 kilogramos de *Pleurotus Ostreatus* como mínimo para obtener un kilogramo de proteína a partir de este sustrato, suponiendo una recuperación de nitrógeno cercana al 100%, que no es el caso para este sustrato bajo las condiciones de trabajo fijadas. Igualmente, si se busca elegir un pretratamiento en específico, se recomendará utilizar secado, debido a que su coste fue de los menores entre los casos estudiados, siendo este de 57,5 [USD/kg_{prot}] en promedio, con el añadido que no requirió de adicionar celulasa como en otros pretratamientos. También, cabe destacar el costo de producción del control, rondando entre 60 y 65 [USD] por kilogramo de producto, siendo esto resultado de su razonable recuperación de nitrógeno, en conjunto al ahorro del consumo eléctrico de realizar algún pretratamiento al sustrato.

7. Conclusiones

Se concluirá que, al realizar hidrólisis enzimática de proteínas, tanto el tipo de pretratamiento como la concentración de proteasas añadidas es clave en el efecto que tiene sobre las variables estudiadas en el hidrolizado proteico de origen fúngico.

Respecto al tipo de pretratamiento, con el uso de secado y secado más celulasa sobre el sustrato se observaron las mayores cantidades de proteína extraída respecto al total, teniendo así que no existe diferencia al adicionar celulasa, lo mismo siendo dicho al añadir proteasa en la hidrólisis enzimática. Así, se observó que el secado sin adición de proteasa y celulasa es el pretratamiento objetivo para maximizar la extracción de proteínas sin utilizar recursos innecesarios. Además, se observó que la extracción de proteína al realizar escaldado como pretratamiento fue menor que la obtenida en el caso de control.

Por otro lado, respecto a la idea de comercializar este tipo de hidrolizado, se pudo observar que actualmente el costo requerido para la producción de este hidrolizado sigue siendo demasiado alto, ya que, el precio en el comercio de proteína hidrolizada de cualquier fuente suele ser menor que el costo para producir proteína de *Pleurotus Ostreatus*. Aun así, queda la puerta abierta a volver a retomar esta propuesta cuando existan formas de cultivar hongos a un costo mucho menor o el trabajar con residuos fúngicos provenientes de producción de otros productos, como puede ser al producir condimentos para sopa, ahorrando así los costos de cultivación del sustrato.

Se recomendará en un futuro investigar acerca de si la adición de celulasa genera algún efecto teniendo en cuenta tiempos de hidrólisis mayores a 1 hora, para saber si nuevamente no surte efecto la adición de celulasa u ocurre lo contrario. También, se dará la idea de hidrolizar residuos fúngicos de otros procesos industriales y conocer si existen variaciones en la cantidad de proteína extraída.

8. Referencias

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Adney, B., & Baker, J. (1996). *Measurement of Cellulase Activities: Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. www.nrel.gov
- Ang, S. S., & Ismail-Fitry, M. R. (2019). Production of different mushroom protein hydrolysates as potential flavourings in chicken soup using stem bromelain hydrolysis. *Food Technology and Biotechnology*, 57(4), 472–480. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.04.19.6294>
- Ayimbila, F., & Keawsompong, S. (2023). Nutritional Quality and Biological Application of Mushroom Protein as a Novel Protein Alternative. In *Current Nutrition Reports* (Vol. 12, Issue 2, pp. 290–307). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13668-023-00468-x>
- Bailey, R., Froggatt, A., & Wellesley Energy, L. (2014). *Livestock-Climate Change's Forgotten Sector Global Public Opinion on Meat and Dairy Consumption*.
- Barbano, D., & Clark, J. (1990). Kjeldahl Method for Determination of Total Nitrogen Content of Milk: Collaborative Study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 73(6), 849–859.
- Barrett, G. C., & Elmore, D. T. (1998). Introduction. In *Amino Acids and Peptides* (pp. 1–19). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9781139163828.002>
- Benjakul, S., & Morrissey, M. T. (1997). *Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes*.
- Camus, M. (2023). *EVALUACIÓN DE PROTEASAS COMERCIALES PARA LA HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE ESQUELÓN DE SALMÓN*.
- Chatterjee, D., Halder, D., & Das, S. (2021). Varieties of Mushrooms and their Nutraceutical Importance: A Systematic Review. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. <https://doi.org/10.7860/jcdr/2021/47240.14660>
- Chitra, K., Venkatesh, R., Dhanalakshmi, K., Sharavanan, P. T., Sasikumar, C. B., & Vijayakumari, K. K. (2018). Production and Economic Analysis of Oyster Mushroom (*Pleurotus florida*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(09), 379–383. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.709.046>
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, 66(6), 1219–1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- Da Silva, R. R. (2021). Enzymatic hydrolysis of non-animal proteins for improving nutritional and sensory properties of foods. In *Journal of Food Biochemistry* (Vol. 45, Issue 9). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13891>
- Damodaran, S., Parkin, K., & Fennema, O. (2008). *Fennema's Food Chemistry* (Vol. 4th).

- Deepalakshmi, K., & Mirunalini, S. (2014). Pleurotus ostreatus: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Biochemical Technology Society*.
- Deepalakshmi K, & Mirunalini S. (2014). Pleurotus ostreatus: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Biochemical Technology Society*.
- Domínguez-Niño, A., Cantú-Lozano, D., Ragazzo-Sanchez, J. A., Andrade-González, I., & Luna-Solano, G. (2018). Energy requirements and production cost of the spray drying process of cheese whey. *Drying Technology*, 36(5), 597–608. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1350863>
- FAO. (2020). *The world is at a critical juncture*. <https://www.fao.org/state-of-food-security-nutrition/2021/en/>.
- Ferreira, I., Morales, P., & Barros, L. (2017). *Wild Plants, Mushrooms and Nuts: Functional Food Properties and Applications*.
- Gargaud, M., Amils, R., & Quintanilla, J. (2011). Encyclopedia of Astrobiology. In *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-11274-4>
- Goswami, B., Majumdar, S., Dutta, R., & Bhowal, J. (2022). Optimization of enzymatic hydrolysis of Pleurotus ostreatus derived proteins through RSM and evaluation of nutritional and functional qualities of mushroom protein hydrolysates. *Brazilian Journal of Food Technology*, 25. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.18620>
- Kristinsson, H., & Rasco, B. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43–81.
- Liceaga, A. M., & Hall, F. (2018). Nutritional, functional and bioactive protein hydrolysates. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 456–464). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21776-9>
- Lieske, B., & Konrad, G. (1994). Protein hydrolysis-the key to meat flavoring systems. *Food Reviews International*, 10(3), 287–312. <https://doi.org/10.1080/87559129409541004>
- Lopez, D. (2019). SACARIFICACIÓN Y FERMENTACIÓN SIMULTÁNEA DE ORUJO DE UVA TINTO PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE SEGUNDA GENERACIÓN.
- Lord, A. K., & Vyas, J. M. (2019). Host Defenses to Fungal Pathogens. In *Clinical Immunology: Principles and Practice* (pp. 413-424.e1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00029-6>
- Mekala, N. K., Potumarthi, R., Baadhe, R. R., & Gupta, V. K. (2014). Current Bioenergy Researches: Strengths and Future Challenges. In *Bioenergy Research: Advances and Applications* (pp. 1–21). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00001-2>
- Merck. (2022). *Cellulase from Aspergillus sp. aqueous solution*. <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/sigma/c2605>
- Mihai, R. A., Melo Heras, E. J., Florescu, L. I., & Catana, R. D. (2022). The Edible Gray Oyster Fungi Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.) P. Kumm a Potent Waste Consumer, a Biofriendly Species with Antioxidant Activity Depending on the Growth Substrate. *Journal of Fungi*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/jof8030274>

- National Institutes of Health. (2021). *Proteínas en la dieta*.
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. In *Food Chemistry and Toxicology JFS: Food Chemistry and Toxicology* (Vol. 66, Issue 5).
- Novozymes. (2014). *Carezyme 4500L Spec*. <https://es.scribd.com/doc/249491589/Carezyme-4500L-Spec>
- Novozymes. (2024). *Alcalase® Plant-based | Novozymes*. <https://www.novozymes.com/en/products/plant-based-foods/alcalase>
- Nyman, M., & Haskå, L. (2013). Vegetable, fruit and potato fibres. In *Fibre-Rich and Wholegrain Foods: Improving Quality* (pp. 193–207). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1533/9780857095787.2.193>
- ONU. (2022). *World Population Prospects 2022 Summary of Results*.
- Palupi, N. W., Windrati, W. S., & , T. (2011). The Effect of Enzymatic Hydrolysis on The Properties of Protein Hydrolysate from Paddy Mushroom. *MAKARA of Technology Series*, 14(2). <https://doi.org/10.7454/mst.v14i2.695>
- Pasupuleti, V. K., & Braun, S. (2010). State of the art manufacturing of protein hydrolysates. In *Protein Hydrolysates in Biotechnology* (pp. 11–32). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_2
- Petrova, I., Tolstorebrov, I., & Eikevik, T. M. (2018). Production of fish protein hydrolysates step by step: technological aspects, equipment used, major energy costs and methods of their minimizing. In *International Aquatic Research* (Vol. 10, Issue 3, pp. 223–241). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0207-4>
- Poshina, D. N., Raik, S. V., Poshin, A. N., & Skorik, Y. A. (2018). Accessibility of chitin and chitosan in enzymatic hydrolysis: A review. In *Polymer Degradation and Stability* (Vol. 156, pp. 269–278). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2018.09.005>
- Sá, A. G. A., Moreno, Y. M. F., & Carciofi, B. A. M. (2020). Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 97, pp. 170–184). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.011>
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 85, Issue 5, pp. 1321–1337). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2343-7>
- Sharifi-Rad, J., Butnariu, M., Ezzat, S. M., Adetunji, C. O., Imran, M., Sobhani, S. R., Tufail, T., Hosseinabadi, T., Ramírez-Alarcón, K., Martorell, M., Maroyi, A., & Martins, N. (2020). Mushrooms-Rich Preparations on Wound Healing: From Nutritional to Medicinal Attributes. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.567518>
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for

- quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, 13(6), 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)
- Tesfaw A, Tadesse A, & Kiros G. (2015). Optimization of oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushroom cultivation using locally available substrates and materials in Debre Berhan, Ethiopia. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. <https://doi.org/10.7324/jabb.2015.3103>
- Tshinyangu, K. K., & Hennebert, G. L. (1996). Protein and chitin nitrogen contents and protein content in *Pleurotus ostreatus* var. *columbinus*. In *Food Chemistry* (Vol. 57, Issue 2).
- Ugalde, U. O., & Castrillo, J. I. (2002). Single Cell Proteins from Fungi and Yeasts. In *Applied Mycology and Biotechnology* (Vol. 2). <http://www.bpfoods.com>
- Valencia, P., Espinoza, K., Ceballos, A., Pinto, M., & Almonacid, S. (2015). Novel modeling methodology for the characterization of enzymatic hydrolysis of proteins. *Process Biochemistry*, 50(4), 589–597. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.028>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, 49(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.11.012>
- Valencia, P., Solis, T., Rojas, P., Ibañez, F., Astudillo-Castro, C., Pinto, M., & Almonacid, S. (2019). Proteolytic susceptibility of food by-product proteins: An evaluation by means of a quantitative index. *Process Biochemistry*, 77, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.009>
- Valencia, P., Valdivia, S., Nuñez, S., Ovissipour, R., Pinto, M., Ramirez, C., Perez, A., Ruz, M., Garcia, P., Jimenez, P., & Almonacid, S. (2021). Assessing the enzymatic hydrolysis of salmon frame proteins through different by-product/water ratios and ph regimes. *Foods*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/foods10123045>
- Vega, K., & Kalkum, M. (2012). Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. In *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2012/920459>
- Vetter, J. (2007). Chitin content of cultivated mushrooms *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes*. *Food Chemistry*, 102(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.037>
- Zhu, Y., Zhang, M., Zhang, L., Law, C. L., Wang, Y., & Liu, K. (2022). Preparation of enzymatic hydrolysate using edible fungi by-products of soup seasoning: Effect of different enzymes on enzymatic hydrolysis. *Food Bioscience*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101844>

9. Anexos

9.1 Anexo A: Procedimiento método Kjeldahl

Siguiendo el procedimiento especificado por (Barbano & Clark, 1990).

Reactivos necesarios:

- Ácido Sulfúrico 95-98% (peso/peso)
- Tabletas Catalizadoras
- Tabletas Antiespumantes
- Ácido Bórico 4% (peso/peso)
- Agua desionizada
- Hidróxido de Sodio 35% (peso/peso)
- Ácido Sulfúrico 0,1 M Estandarizado
- Azul de bromotimol

Equipos Utilizados:

Tabla 11. Equipos Utilizados Procedimiento Kjeldahl.

Equipo	Especificación
Digestor Automático	Velp Scientifica DKL Digestion Unit
Scrubber	Velp Scientifica SMS Scrubber
Bomba de Vacío	Velp Scientifica SRL
Chiller	Velp Scientifica Smart H50-500
Destilador con Vapor	Velp Scientifica UDK 129
Titulador Automático	Mettler Toledo G10S

Procedimiento:

- Se añadieron 500 [µL] de muestra en cada tubo del digestor, además de una pastilla catalizadora y antiespumante suministrada por el distribuidor.
- Se diluyó una parte de la solución de NaOH 35% (peso/peso) a una 17% (peso/peso), agregar 1 Litro de esta nueva solución en conjunto con azul de bromotimol a un recipiente que estará conectado al Scrubber necesario para operar el Digestor Automático.
- Prender el Chiller, para que la corriente de agua se encuentre constantemente a temperaturas bajas. Esto en conjunto de encender la bomba de vacío.
- Al mismo tubo se agregó 15 [mL] de Ácido sulfúrico 95-98% (peso/peso) siguiendo los protocolos de seguridad respectivos.
- Insertar los tubos con su soporte adherido al equipo Digestor, el cual se encenderá y funcionará durante un periodo de 30 minutos a 250 [°C], otros 30 minutos a 350 [°C] y finalmente 90 minutos a 420 [°C]. Considerar un tiempo mínimo de espera cercano a los 60 minutos para que se enfríen los tubos ya terminado el funcionamiento del equipo.

- Posteriormente, a cada tubo se le agrego un total de 50 [mL] de agua desionizada para aumentar el volumen de la muestra sin adicionar nitrógeno.
- El Destilador con vapor se interconectará a un recipiente con solución NaOH 35% (peso/peso) y 2 Litros de agua desionizada.
- Así, se colocó el tubo en el equipo Destilador con vapor. Además, se introdujo un recipiente con 30 [mL] de Ácido Bórico 4% (peso/peso) en la salida del equipo, cuidando que la manguera quede al fondo del recipiente.
- De esta manera, el Destilador funciono durante 5 minutos con una cantidad de NaOH introducida de 53 [mL] por cada tubo.
- Después, cada recipiente resultante de cada tubo utilizado tuvo que pasar por una titulación volumétrica añadiendo ácido sulfúrico 0,1 [M] estandarizado. Esto hasta encontrar el primer punto equivalente en esta titulación, y así obtener el contenido de nitrógeno en la muestra.

Para conseguir el contenido de nitrógeno, se usó la siguiente ecuación (Barbano & Clark, 1990):

$$\text{Nitrogeno [\%]} = \frac{1,4007 * (V_S - V_B) * N}{W}$$

Siendo, V_S y V_B los volúmenes en mililitros de Ácido sulfúrico 0,1 [M] usados para titular la muestra y el blanco (sin muestra añadida) respectivamente. Para este caso en particular, se consideró que V_B sería despreciable y no debería tomarse en cuenta. Por otro lado, N y W son la normalidad de la solución de Ácido sulfúrico y el peso de la muestra introducida originalmente en gramos.

9.2 Anexo B: Calculo Dosis de Proteasa Adicionada

Para este cálculo, se consideró una concentración de proteasa 1,68; 0,84 y 0,42 [mAU/g_{champiñon}] en cada caso. Para cuantificar la dosis añadida se hicieron los siguientes cálculos, teniendo en cuenta que la cantidad de champiñón ostra húmedo es de 25 gramos, la actividad específica de la Alcalase es de 2500 [mAU/g_{enzima}] y la densidad de esta proteasa es de 1,08 [g/mL]:

$$Dosis_{proteasa} \left[\frac{mL_{proteasa}}{mezcla} \right] = \frac{\left(E_{proteasa, champ} \left[\frac{mAU}{g_{champ}} \right] * g_{champ} \left[\frac{g_{champ}}{mezcla} \right] \right)}{A_{enz, Alcalase} \left[\frac{mAU}{g_{proteasa}} \right] * \rho_{enz, Alcalase} \left[\frac{g_{proteasa}}{mL_{proteasa}} \right]}$$

$$Dosis_{proteasa} \left[\frac{mL_{proteasa}}{mezcla} \right] = \frac{\left(E_{proteasa, champ} \left[\frac{mAU}{g_{champ}} \right] * 25 \left[\frac{g_{champ}}{mezcla} \right] \right)}{2500 \left[\frac{mAU}{g_{proteasa}} \right] * 1,08 \left[\frac{g_{proteasa}}{mL_{proteasa}} \right]}$$

Resultando así, en una dosis de 3,9; 7,8 y 15,6 [μL] de proteasa, teniendo una concentración de proteasa de 0,42; 0,84 y 1,68 [mAU/g_{champiñon}] respectivamente.

9.3 Anexo C: Calculo Dosis de Celulasa Adicionada

Para este cálculo, se consideró una concentración de celulasa de 76,72 [FPU/g_{quitina}], valor dentro del rango de estudio de investigaciones anteriores (Lopez, 2019). Ahora, para cuantificar la dosis añadida, se hicieron los siguientes cálculos, teniendo en cuenta un contenido de quitina de 3,29% promedio en champiñón ostra seco (Vetter, 2007):

$$\begin{aligned}
 Celu_{champ} \left[\frac{FPU}{g_{champ\ seco}} \right] &= Celu_{champ} \left[\frac{FPU}{g_{quitina}} \right] * \%_{quitina, champ\ seco} \left[\frac{g_{quitina}}{g_{champ\ seco}} \right] \\
 Celu_{champ} \left[\frac{FPU}{g_{champ\ seco}} \right] &= 76,72 \left[\frac{FPU}{g_{quitina}} \right] * 0,0329 \left[\frac{g_{quitina}}{g_{champ\ seco}} \right] = 2,524
 \end{aligned}$$

Así, al momento de definir la cantidad de enzima adicionada por experimento, se debe considerar una muestra de champiñón ostra en peso seco agregada de 2 gramos, debido a que el contenido de agua presente en el champiñón ostra promedio es de 92%.

$$\begin{aligned}
 Dosis_{celulasa} \left[\frac{mL_{celulasa}}{mezcla} \right] &= \frac{\left(Celu_{champiñon} \left[\frac{FPU}{g_{champ\ seco}} \right] * \%_{champ\ seco, mezcla} \left[\frac{g_{champ\ seco}}{g_{mezcla}} \right] \right)}{A_{enz, Carezyme} \left[\frac{FPU}{mL_{celulasa}} \right]} \\
 Dosis_{celulasa} \left[\frac{mL_{celulasa}}{mezcla} \right] &= \frac{\left(2,524 \left[\frac{FPU}{g_{champ\ seco}} \right] * 1,875 \left[\frac{g_{champ\ seco}}{g_{mezcla}} \right] \right)}{81,74 \left[\frac{FPU}{mL_{enzima}} \right]} = 0,0579 \left[\frac{mL_{celulasa}}{mezcla} \right]
 \end{aligned}$$

Resultando así, en una dosis de 57,9 [μL] de celulasa por experimento.

9.4 Anexo D: Elaboración Reactivo OPA

Siguiendo los pasos de (Nielsen et al., 2001) para su elaboración se requirió lo siguiente:

Reactivos necesarios:

- Borato de sodio decahidratado (Bórax)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS)
- O-ftalaldehído (OPA)
- Ditiotreitól (DTT)
- Agua desionizada
- Etanol 97% (p/p)

Equipos Utilizados:

Tabla 12. Equipos Utilizados para la elaboración reactivo OPA.

Equipo	Especificación
Balanza Analítica	Boeco BAS 31 Plus
Agitador Magnético Con Calefacción	SCIOLOGEX MS-H-S10
Agitador Vortex	Velp Scientifica ZX3

Procedimiento:

- Para la elaboración de 100 [mL] de reactivo OPA (base de cálculo), primero se usó un vaso precipitado para agregar aproximadamente 50 [mL] de agua desionizada y dejar en el agitador magnético a 70 [°C].
- Mientras se calienta el agua, se utilizó la balanza analítica para poder pesar en recipientes de plástico 3,810 y 0,1 gramos de reactivo Bórax y SDS respectivamente.
- Agregar reactivos al vaso precipitado, y colocar un vidrio reloj sobre el vaso precipitado, para que no se escapen los gases, debido al aumento de la temperatura.
- Se uso nuevamente la balanza analítica para pesar en recipientes de plástico 0,080 y 0,088 gramos de reactivo OPA (solido) y DTT respectivamente.
- Después, en un tubo Falcon de 15 [mL] se disolvió 0,080 [g] de OPA (reactivo solido) en 2 [mL] de etanol 97% (p/p) utilizando el agitador Vortex. El tiempo necesario para disolver dependerá de la cantidad de OPA agregado.
- Se agrego la solución de etanol más OPA y los 0,088 [g] de DTT al vaso precipitado original.
- Esperar a que se disuelva en su totalidad en el vaso precipitado.
- Posteriormente, se retiró el vaso precipitado del agitador magnético y se recubrió el vaso precipitado con aluminio, para prevenir que el reactivo OPA absorba luz y se degrade, afectando así la estabilidad del reactivo y su eficiencia.
- Cuando la solución ya se encuentre a temperatura ambiente, se aforo con un matraz de aforo de 100 [mL]. Resultando así, en la elaboración completa del reactivo OPA.
- Posteriormente, este reactivo se almaceno en botellas de vidrio ámbar para evitar que absorba luz en lo posible.

9.5 Anexo E: Procedimiento Curva de Serina

Para su elaboración se requirió lo siguiente:

Reactivos necesarios:

- Serina
- Agua desionizada
- Reactivo OPA (Revisar “**Anexo D**”)

Equipos Utilizados:

Tabla 13. Equipos Utilizados para la elaboración reactivo OPA.

Equipo	Especificación
Balanza Analítica	BOECO BAS 31 Plus
Espectrofotómetro	Thermo Scientific Orion Aquamate 8000
Celdas de Vidrio	-

Procedimiento:

- Primero, se hizo un dilución de la serina presente añadiendo agua destilada. Para esto es recomendado el utilizar tubos Eppendorf de 2 [mL] como sitio para realizar la dilución. Las diluciones serán de 20, 40, 60,80 y 100 [mg/L] de serina respectivamente.
- La absorbancia leída por el espectrofotómetro se fijó en 340 [nm].
- Para hacer una medición, dentro de la celda de vidrio se añadieron 200 [μL] de la muestra en específico, agregando 1,5 [mL] de reactivo OPA.
- Instantes posteriores, se introdujo la celda de vidrio al espectrofotómetro durante 2 minutos aproximadamente y poder medir la absorbancia de la celda.
- Se realizaron estas mediciones para cada dilución en triplicado, con un agregado de un blanco que, en vez de muestra, lleve solamente 200 [μL] de agua desionizada más 1,5 [mL] de reactivo OPA.

De esta manera, se obtuvo el siguiente grafico:

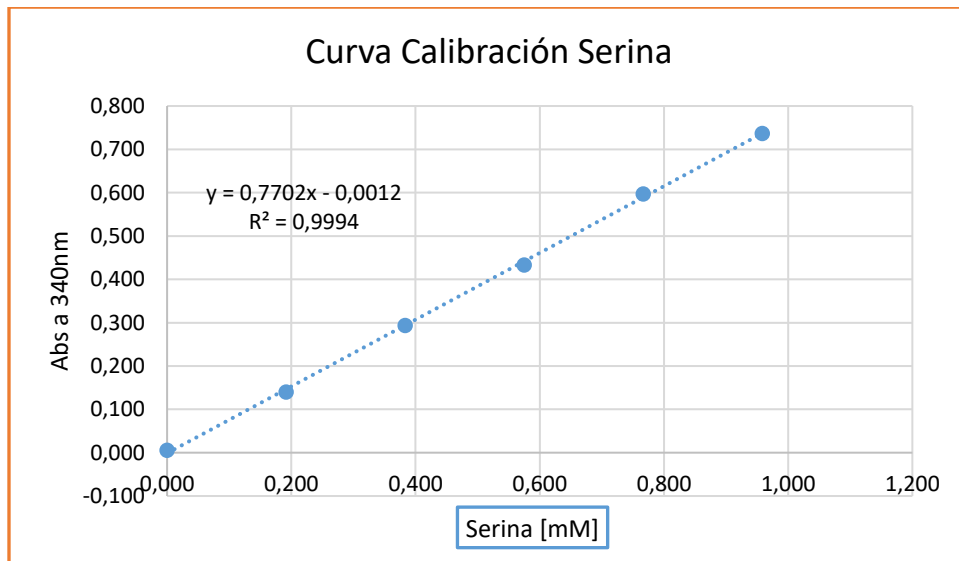


Figura 19. Curva de Serina Estándar.

Siendo el eje de las abscisas la concentración de Serina en [mM] y en las ordenas la medición promedio de la absorbancia para ese concentración de Serina en específico. Recordando que, en la selección de estos datos, el error relativo para los datos de la misma dilución debe ser menor al 5% para que sean considerados como aceptados, en caso de que esto no ocurra en las 3 réplicas, repetir las diluciones hasta llegar a lo requerido.

9.6 Anexo F: Prueba de Significancia

Tabla 14. Resultados de prueba de significancia aplicada sobre el parámetro "a", presente en modelo ajustado para cuantificar grupos α -amino en champiñón ostra.

ID	Parámetro a	Error Standard	t ₀	¿Es significativa?
E-1	0,0156	0,0026	5,9706	Significante
E-2	0,1860	0,0293	6,3420	Significante
E-3	0,4447	0,0637	6,9810	Significante
E-4	0,6203	0,0588	10,5478	Significante
S-1	0,8020	0,1156	6,9351	Significante
S-2	2,6406	0,5093	5,1845	Significante
S-3	0,5445	0,0453	12,0187	Significante
S-4	1,1559	0,2359	4,9003	Significante
SC-1	1,0742	0,1194	8,9973	Significante
SC-2	0,8840	0,0859	10,2896	Significante
SC-3	0,4340	0,0306	14,1778	Significante
SC-4	1,6894	0,2660	6,3516	Significante
Ctrl-1	2,2417	0,9326	2,4037	No Significante
Ctrl-2	0,6162	0,1325	4,6521	Significante

Tabla 15. Resultados de prueba de significancia aplicada sobre el parámetro "a", presente en modelo ajustado para cuantificar grupos α -amino en champiñón ostra.

ID	Parámetro b	Error Standard	t ₀	¿Es significativa?
E-1	0,0001	0,4190	0,0002	No Significante
E-2	0,1849	0,0552	3,3475	Significante
E-3	0,1400	0,0328	4,2637	Significante
E-4	0,2005	0,0177	11,3419	Significante
S-1	0,1765	0,0223	7,9094	Significante
S-2	0,2989	0,0163	18,2933	Significante
S-3	0,1516	0,0143	10,5797	Significante
S-4	0,2396	0,0326	7,3587	Significante
SC-1	0,1784	0,0153	11,6837	Significante
SC-2	0,2009	0,0140	14,3529	Significante
SC-3	0,1202	0,0124	9,6871	Significante
SC-4	0,2928	0,0250	11,7244	Significante
Ctrl-1	0,5759	0,0963	5,9787	Significante
Ctrl-2	0,3979	0,0597	6,6674	Significante

9.7 Anexo G: Test de Anova.

Tabla 16. Resultados Test de Anova sobre distintas variables evaluadas.

Conjunto	Medición	Valor F	F critico	¿Diferencia Significante?
Escaldado	Recuperación Nitrógeno	104,40	6,59	Si
Secado	Recuperación Nitrógeno	2,27	6,59	No
Secado + Celulasa	Recuperación Nitrógeno	10,73	6,59	Si
Autolisis	Recuperación Nitrógeno	7,95	18,51	No
Escaldado	Fase Soluble	0,36	6,59	No
Secado	Fase Soluble	3,47	6,59	No
Secado + Celulasa	Fase Soluble	11,65	6,59	Si
Autolisis	Fase Soluble	7,71	18,51	No
Escaldado	Grado de Hidrolisis	122,00	6,59	Si
Secado	Grado de Hidrolisis	0,32	6,59	No
Secado + Celulasa	Grado de Hidrolisis	5,65	6,59	No
Autolisis	Grado de Hidrolisis	1,36	18,51	No
Escaldado	Grupos α -amino	119,77	6,59	Si
Secado	Grupos α -amino	2,02	6,59	No
Secado + Celulasa	Grupos α -amino	4,10	6,59	No
Autolisis	Grupos α -amino	0,00	18,51	No

9.8 Anexo H: Test de Tukey.

Tabla 17. Resultados Test de Tukey aplicados sobre resultados con diferencias significativas presentes en el Test de Anova.

Conjunto	Medición	Concentración Proteasa Grupos [mAU/g _{champ}]	HSD	Diferencia Absoluta Promedios	¿Diferencia Significante?
Escaldado	Recuperación Nitrógeno	0; 0,42	4,562	8,24	Si
Escaldado	Recuperación Nitrógeno	0; 0,84	4,562	13,69	Si
Escaldado	Recuperación Nitrógeno	0; 1,68	4,562	18,94	Si
Escaldado	Recuperación Nitrógeno	0,42; 0,84	4,562	5,45	Si
Escaldado	Recuperación Nitrógeno	0,42; 1,68	4,562	10,70	Si
Escaldado	Recuperación Nitrógeno	0,84; 1,68	4,562	5,25	Si
Secado + Celulasa	Recuperación Nitrógeno	0; 0,42	8,910	11,59	Si
Secado + Celulasa	Recuperación Nitrógeno	0; 0,84	8,910	7,75	No
Secado + Celulasa	Recuperación Nitrógeno	0; 1,68	8,910	9,58	Si
Secado + Celulasa	Recuperación Nitrógeno	0,42; 0,84	8,910	3,84	No
Secado + Celulasa	Recuperación Nitrógeno	0,42; 1,68	8,910	2,01	No
Secado + Celulasa	Recuperación Nitrógeno	0,84; 1,68	8,910	1,83	No
Escaldado	Grado de Hidrolisis	0; 0,42	1,615	3,06	Si
Escaldado	Grado de Hidrolisis	0; 0,84	1,615	6,42	Si
Escaldado	Grado de Hidrolisis	0; 1,68	1,615	6,45	Si
Escaldado	Grado de Hidrolisis	0,42; 0,84	1,615	3,36	Si
Escaldado	Grado de Hidrolisis	0,42; 1,68	1,615	3,39	Si
Escaldado	Grado de Hidrolisis	0,84; 1,68	1,615	0,03	No
Escaldado	Grupos α -amino	0; 0,42	2,610	5,02	Si
Escaldado	Grupos α -amino	0; 0,84	2,610	10,53	Si
Escaldado	Grupos α -amino	0; 1,68	2,610	10,12	Si

Escaldado	Grupos α -amino	0,42; 0,84	2,610	5,51	Si
Escaldado	Grupos α -amino	0,42; 1,68	2,610	5,09	Si
Escaldado	Grupos α -amino	0,84; 1,68	2,610	0,42	No