

Review

Estrategias de inmovilización de alcalasas para la obtención de polipéptidos bioactivos a partir de huesos de pollo: una revisión de literatura.

Ana Maria Bermeo Gonzalez^{a*}, Angie Nathaly Benavides Rosero^{a*}

^a Departamento de Ingeniería Bioquímica, Universidad Icesi, Cali 760008, Colombia.

INFO DEL ARTÍCULO

Palabras clave:

Alcalasa
Péptidos
Inmovilización
Hidrólisis
Huesos de pollo
Polipéptidos bioactivos

RESUMEN

En los últimos años la demanda por la industria avícola ha aumentado y con ello la generación de residuos sólidos. Los subproductos como los huesos de pollo han despertado el interés por contener una gran cantidad de nutrientes con potencial para generar compuestos de mayor valor agregado como los polipéptidos bioactivos. Una forma de obtenerlos es mediante hidrólisis enzimática utilizando alcalasas inmovilizadas, debido a su alta eficiencia y estabilidad. No obstante, los estudios sobre estrategias de inmovilización de alcalasas para la obtención de péptidos bioactivos a partir de subproductos avícolas son pocos y no hay técnicas claras que establezcan el uso de huesos de pollo. Por tanto, este artículo aporta información sobre estrategias de inmovilización de alcalasas que ayudan en la obtención de polipéptidos bioactivos a partir de la hidrólisis de huesos de pollo, cuya materia prima se aprovecha de manera limitada por su compleja composición. Para esto, se llevó a cabo una revisión crítica de literatura en Scopus en la cual se contrastaron diferentes sustratos y estrategias de inmovilización de alcalasas. Los resultados sugieren que la técnica de inmovilización más adecuada es mediante unión covalente multipunto en partículas de sílice magnética, debido que presenta buena estabilidad operativa, se obtienen péptidos de bajo peso molecular y los problemas por difusión son reducidos. Por otra parte, las condiciones más adecuadas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática son pH 7-10, temperatura entre 50-55°C, tiempo de 90-180 min y el uso de sistemas batch repetidos para reutilizar el biocatalizador.

1. Introducción

La producción avícola en Colombia se ha convertido en uno de los mayores motores para el impulso de la economía, pues genera cerca de 1.600.000 toneladas de pollo por año equivalentes a aproximadamente 17.5 billones de pesos, sin embargo, también es una industria que representa una considerable fuente de contaminación por residuos sólidos a cuerpos de agua, aire y suelos, debido al tratamiento por métodos tradicionales como quema a cielo abierto y entierro en rellenos sanitarios (Federación Nacional de & Avicultores de Colombia, 2018; Arévalo Bohórquez, 2014). Por esto y sumado a la creciente demanda de consumo, es necesario evaluar las corrientes alternas a la cadena de procesamiento principal y con ello la implementación de estrategias que permitan disminuir y valorizar la mayor cantidad de desperdicios. Dentro de estos, los subproductos como los huesos (equivalentes al 15% o a 240.000 toneladas de la producción anual) han despertado el interés por contener proteínas y otros nutrientes esenciales con potencial de ser aprovechados para obtener hidrolizados con propiedades bioactivas (Teshnizi et al., 2020).

La hidrólisis enzimática con el uso de proteasas libres es una alternativa a los procesos químicos para la generación de polipéptidos bioactivos, en vista de que presenta ventajas operacionales que mejoran las propiedades nutricionales y funcionales de los productos sin pérdida estructural de los aminoácidos y sin mayores requerimientos de energía. No obstante, tiene deficiencias como los altos costos de separación, autólisis e inestabilidad enzimática y la potencial aparición de inhibidores, por lo que el actual interés científico se dirige hacia su optimización (Hou et al., 2017a; Colla et al., 2015; Awuor et al., 2017). De esta manera, técnicas como la inmovilización pueden aportar robustez y resistencia a las enzimas frente a la temperatura, presión y diferentes solventes orgánicos, no solo con el fin de reutilizarse en otros procesos, facilitar el almacenamiento y reducir costos, sino también para mejorar las funciones catalíticas como la actividad, estabilidad y la selectividad, lo que conlleva al estudio y desarrollo constante de nuevas tecnologías para aumentar la eficiencia de reacciones catalizadas por enzimas (Glomm et al., 2021a; Cao, 2011).

Entre las proteasas más utilizadas, la subtilisina o conocida comercialmente como "alcalasa", ha demostrado ser una de las más eficientes para hidrolizar diferentes sustratos con alta actividad y estabilidad enzimática a pH alcalinos, en aplicaciones como formulaciones en productos de limpieza, ablandamiento de carnes, tratamiento de cueros, etc., siendo especialmente interesante su implementación en residuos proteicos de las industrias agrícola y alimentaria, debido a su potencial para obtener péptidos con actividades antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas, anticoagulantes, antitumorales, entre otras (Žuža et al., 2017; Tacias-Pascacio et al., 2020). La bioactividad de estos segmentos específicos de proteínas se pueden utilizar en el tratamiento y prevención de condiciones médicas, pero depende de la materia prima a hidrolizar, así como de la especificidad y selectividad de las enzimas (Sun et al., 2020; Lemes et al., 2016).

Actualmente, la información disponible en diversas bases de datos exhibe el uso de alcalasas libres e inmovilizadas en diversos soportes para la producción de hidrolizados poco caracterizados, específicamente en materias primas como la soya, caseína, clara de huevo y unos pocos en los subproductos de la industria pesquera y avícola. Respecto a esta última, existen dos investigaciones que representan los primeros ejemplos de hidrólisis de materias primas complejas y de relevancia industrial, al inmovilizar alcalasas en partículas de sílice magnética utilizando tres ligandos de amina diferentes y piedra pómez en una columna de vidrio (Glomm et al., 2021a; Robotjazi, 2020). Sin embargo, se centran en el aprovechamiento de residuos combinados como carne adherida, tendones, huesos, sangre, cabezas, patas, plumas, y no en el uso de alguno en específico.

Lo anterior demuestra que la hidrólisis de huesos de pollo con alcalasas inmovilizadas no es muy estudiada, posiblemente por: la composición heterogénea difícil de manejar; el menor contenido de proteína en comparación con otros residuos; los altos costos sujetos al pretratamiento y disminución en la actividad enzimática por los soportes de inmovilización (Wubshet et al., 2018; Lima et al., 2019). Así pues, esta revisión crítica de literatura pretende contrastar diferentes estrategias de

* E-mail: anambgz7@hotmail.com (A.M Bermeo), anbenavides@icesi.edu.co (A.N Benavides)

inmovilización de alcalasas, con el fin de presentar una potencialmente funcional para la hidrólisis de huesos de pollo en la obtención de polipéptidos bioactivos.

2. Contexto

2.1. Potencial de los huesos de pollo

La industria del procesamiento de pollo genera una gran cantidad de residuos sólidos que en su mayoría se disponen de manera deficiente. Los huesos de pollo son uno de estos subproductos y por lo regular se aprovechan de forma limitada como suplemento en la alimentación animal o como fertilizantes orgánicos, sin embargo, han recibido atención debido a que contienen una gran cantidad de proteínas, colágeno, calcio, ácidos grasos, aminoácidos y demás nutrientes con potencial para generar compuestos funcionales de mayor valor agregado (Cansu & Boran, 2015; Moutinho et al., 2017). Por ejemplo, algunos estudios han empleado huesos de pollo como materia prima en: la producción de carbonato de apatita para la preparación de injertos óseos; la producción de carbón activado para su aplicación en supercondensadores; la catálisis para la producción de biodiesel; la extracción de hidroxiapatita; la eliminación de fosfatos de soluciones acuosas y la obtención de polipéptidos con propiedades bioactivas por hidrólisis de proteínas, entre otros (Xuan et al., 2021; Tarimo et al., 2022; Kader et al., 2021; Vijayaraghavan et al., 2022; Kasim et al., 2020).

2.2. Péptidos bioactivos

Los péptidos bioactivos son secuencias cortas de 2-30 aminoácidos (AA) unidos mediante enlaces covalentes o amida, con peso molecular entre 400-2000 Da (Maestri et al., 2018; Lafarga et al., 2017). Su bioactividad deriva de la composición de la materia prima (animal o vegetal) y tienen efectos positivos sobre la salud por el tratamiento y prevención de condiciones médicas como la coagulación, obesidad, cáncer, metabolismo intestinal, etc., debido a sus propiedades antihipertensivas, antioxidantes, antidiabéticas, antimicrobianas y antiinflamatorias. Aunque algunos péptidos se encuentran libres de forma natural, la mayoría hacen parte de la estructura de las proteínas y son liberados generalmente mediante hidrólisis enzimática por la ventajas que conlleva su implementación (Sánchez & Vásquez, 2017). A pesar de esto, la comunidad científica se ha enfrentado a varios obstáculos para la obtención, identificación, caracterización, evaluación y usos de polipéptidos bioactivos, sobre todo desde el punto de vista tecnológico para producirlos a gran escala y mantener sus propiedades.

2.3. Hidrólisis enzimática de proteínas

Tabla 1). Cada una presenta ventajas y limitaciones según la enzima, material de soporte, sustrato y reacción, por lo que es un desafío hallar las condiciones para cada proceso específico, como una alternativa al uso de enzimas libres.

3. Metodología

El proceso de búsqueda y selección bibliográfica comprende las etapas: revisión sistemática de literatura; bibliometría y selección de los artículos.

La hidrólisis enzimática al igual que el proceso químico, se basa en la ruptura del enlace peptídico de una proteína en un medio acuoso, pero con el uso de una enzima proteasa. A lo largo del tiempo se ha convertido en una herramienta valiosa y flexible para mejorar las propiedades nutricionales y funcionales de las proteínas, debido a los beneficios en comparación con la hidrólisis química convencional. Condiciones como la temperatura y el pH son moderadas (pH neutros-alcalinos y temperaturas menores a 80°C) por lo que no ocasiona la pérdida estructural de aminoácidos, la hidrólisis es más específica, la inactivación del biocatalizador es sencilla después del proceso, los requerimientos energéticos son menores, la huella de carbono es reducida y se obtienen péptidos de longitud variable con una salinidad baja (Hou et al., 2017; Colla et al., 2015). No obstante, las principales desventajas como los altos costos y la presencia potencial de inhibidores enzimáticos representan un desafío para el desarrollo y aplicación de dicha estrategia (Hou et al., 2017a).

2.4. Alcalasas

Proteasas como las alcalasas son serina endopeptidasas con sitios activos conformados por la tríada catalítica clásica de aminoácidos: aspartato como electrófilo, histidina como base y serina como nucleófilo, siendo esta última esencial para la posterior unión al sustrato y corte de la proteína (Novozymes, 2016). Las alcalasas se caracterizan por su actividad y estabilidad a pH alcalinos, además, por la variedad de aminoácidos que puede identificar, es probable la obtención de hidrolizados de pequeño tamaño (Tacias-Pascacio et al., 2020). Ahora, si bien es una de las más utilizadas por su versatilidad en muchas industrias, los procesos de hidrólisis no están exentos de dificultades desde el punto de vista de las alcalasas. Estas enzimas pueden sufrir de autólisis por condiciones del medio como temperatura o pH y degradación por otras proteasas debido a que también se componen de proteínas, al igual que de inhibición por producto lo que reduce la velocidad de reacción (Auwor et al., 2017).

2.5. Inmovilización enzimática

La inmovilización provee de propiedades químicas, físicas y mecánicas que puede aportar a las enzimas robustez y resistencia frente a condiciones del medio como temperatura, presión y solventes orgánicos, con el fin de mejorar su estabilidad y selectividad, así como disminuir los costos asociados por su separación y almacenamiento (Glomm et al., 2021; Cao et al., 2011). Por otro lado, se trata de una tecnología que puede afectar de manera negativa el rendimiento de operación por la pérdida de actividad y menor velocidad de reacción en comparación con las enzimas libres (Basso et al., 2019). Son reconocidas seis metodologías tradicionales de inmovilización enzimática: quelación, encapsulación, adsorción, atrapamiento, unión covalente, y entrecruzamiento (

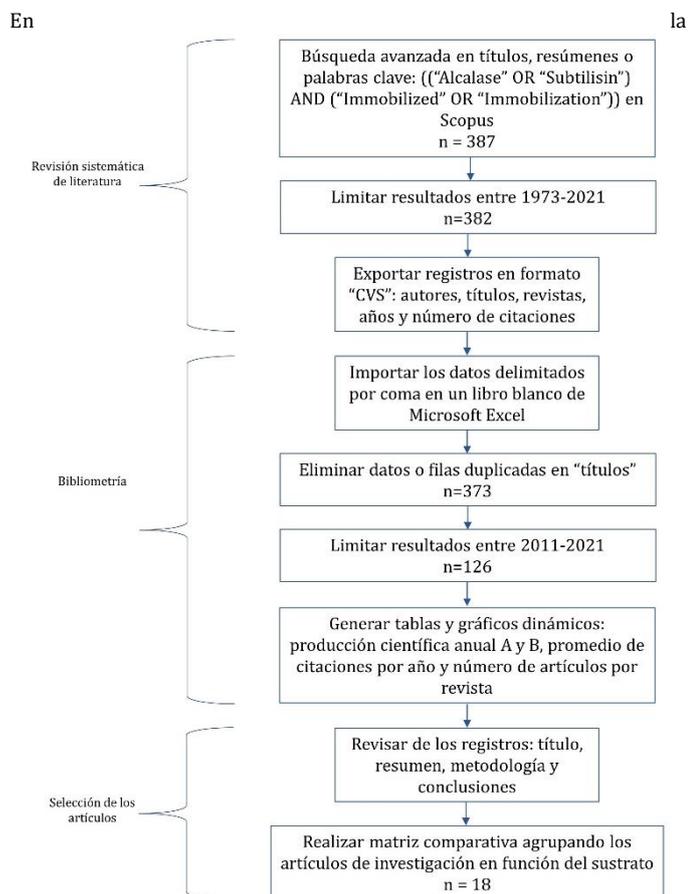


Figura 1 se presenta el algoritmo llevado a cabo.

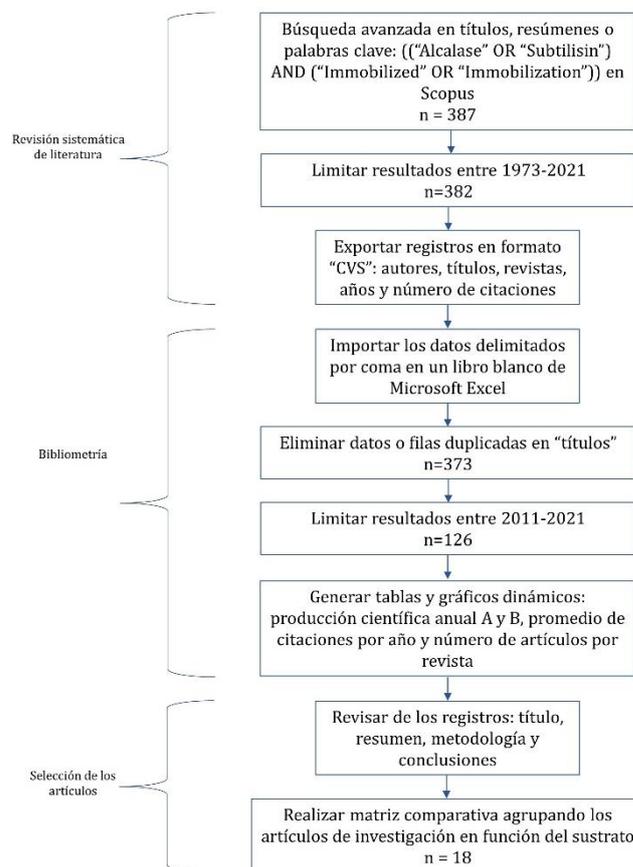
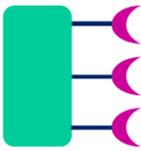


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología de revisión y selección realizada.

Tabla 1. Técnicas de inmovilización enzimática y sus ventajas y desventajas. Elaboración propia.

Técnica de inmovilización	Fundamento	Ventajas	Desventajas	Referencias
<p>Quelación</p> 	Unión de los aminoácidos de la enzima a iones metálicos de la superficie del soporte	<p>Fácil regeneración del soporte</p> <hr/> <p>La unión entre la enzima y el soporte es fuerte, además es reversible</p>	<p>Reducción de la actividad por la unión de los metales al sitio activo de la enzima</p> <hr/> <p>Los reactivos involucrados pueden no ser seguros para productos de consumo</p>	(Krishnamoorthi et al., 2015; Kouachi et al., 2012)
<p>Encapsulamiento</p> 	La enzima se confina en una membrana semipermeable para garantizar solo el paso de sustrato y producto	<p>Protección de la enzima ante agentes microbianos</p> <hr/> <p>Fácil separación posterior</p>	<p>Posible ruptura de la membrana</p> <hr/> <p>Limitaciones en la transferencia de masa por la</p>	(Krishnamoorthi et al., 2015; Eş et al., 2015a)

				difusión del sustrato y el producto
<p>Adsorción</p> 	<p>Unión entre la superficie del soporte y la enzima por enlaces débiles de hidrógeno, Van der Waals e interacciones iónicas</p>	<p>No requiere adición de agentes químicos</p> <hr/> <p>Hay poco cambio estructural de la enzima nativa (alta actividad catalítica)</p>	<p>Adsorción inespecífica</p> <hr/> <p>Posible pérdida de biomoléculas</p>	<p>(Hassan et al., 2019a; Guisan, 2013a; Chakraborty et al., 2016a; Eş et al., 2015a)</p>
<p>Atrapamiento</p> 	<p>Introducción de la enzima en una matriz porosa de gel o polímero</p>	<p>No requiere modificaciones por agentes químicos</p> <hr/> <p>Estabilidad alta de operación</p>	<p>Es probable la fuga de la enzima a través del material</p> <hr/> <p>La matriz puede conducir a la inactivación de la enzima</p>	<p>(Mustafa, 2015; Liu, 2017; Górecka & Jastrzębska, 2011)</p>
<p>Unión covalente</p> 	<p>Unión entre los grupos funcionales de la enzima y los del soporte</p>	<p>Baja resistencia difusional</p> <hr/> <p>Proporciona gran resistencia térmica por la unión fuerte y balanceada entre la enzima y el soporte</p>	<p>Mayor pérdida de actividad</p> <hr/> <p>Puede involucrar productos químicos agresivos</p>	<p>(Hassan et al., 2019a; Kuswandi, 2014b; Kurbanoglu et al., 2018; Guisan, 2013a)</p>
<p>Entrecruzamiento</p> 	<p>Unión entre las enzimas para formar una gran molécula</p>	<p>No depende de un material de soporte</p> <hr/> <p>Se incrementa la actividad específica enzimática</p>	<p>Adición de químicos agresivos</p> <hr/> <p>Puede alterar el sitio activo de la enzima</p>	<p>(Velasco-Lozano et al., 2016; Kuswandi, 2014b; Eş et al., 2015a)</p>

El proceso de revisión sistemática de literatura se realizó mediante la identificación y selección de información relacionada con métodos de inmovilización de alcalasas para la obtención de polipéptidos bioactivos en artículos e investigaciones disponibles en la base de datos Scopus. Por consiguiente, dado que no toda la información es relevante y específica, se construyó una fórmula de búsqueda avanzada para limitar los resultados utilizando los términos ((“Alcalase” OR “Subtilisin”) AND (“Immobilized” OR “Immobilization”)) en títulos, resúmenes y palabras clave desde 1973 hasta 2021. Finalmente, se obtuvo una lista con todos los documentos, a fin de exportarla en formato “CSV” y utilizarla en el posterior análisis bibliométrico con la herramienta de manejo de datos Microsoft Excel.

3.2. Bibliometría

Se importaron los datos delimitados por coma desde el archivo “CSV” previamente descargado a un libro en blanco de Microsoft Excel. A continuación, se eliminaron las filas duplicadas por “título” y se insertaron tablas dinámicas con sus respectivos gráficos filtrando entre los años 2011 y 2021 (Figura 2B).

3.3. Selección de los artículos

Seguido, se procedió a revisar en cada una los apartados: título, resumen, metodología y conclusiones. De esta manera, se construyó una nueva lista con aquellos documentos que establecían una metodología de inmovilización de alcalasas, teniendo en cuenta factores técnicos, variables evaluadas, sustratos empleados y productos generados (los criterios de selección se presentan en la Tabla 2). Por último, dichas investigaciones se agruparon en función del tipo de sustrato, con el propósito de relacionar sus propiedades fisicoquímicas con los huesos de pollo y posteriormente contrastar características de las metodologías de inmovilización.

Tabla 2. Criterios de selección de los artículos.

Factor	Criterio
Catalizador	Alcalasa o Subtilisina; sin catálisis simultánea con otras enzimas
Sustrato	Proteína vegetal o animal
Producto	Hidrolizados de proteínas; con o sin caracterización
Sistema	Inmovilización; independiente del tipo
Condiciones	pH, temperatura y tiempo de hidrólisis
Variables para evaluar	Actividad, grado de hidrólisis y/o ciclos de reutilización

4. Resultados y discusión

4.1. Bibliometría

La búsqueda inicial en Scopus con la fórmula ((“Alcalase” OR “Subtilisin”) AND (“Immobilized” OR “Immobilization”)) arrojó 387 resultados y una vez eliminados los duplicados, estos disminuyeron a 378. De esta manera, para evaluar el impacto científico se consideraron indicadores como la producción científica anual, promedio total de citas por año y revistas de publicación.

En la Figura 2A se aprecia que, durante los años 70 y 80 la producción científica era muy baja, probablemente debido a que el campo de inmovilización enzimática se encontraba aún muy inexplorado. Es entonces que, a partir de los años 90 se evidencia un crecimiento y esto puede sustentarse en la necesidad de obtener proteínas de diversas fuentes a partir de procesos enzimáticos mejorados. No obstante, durante las últimas dos décadas (2000-2010 y 2011-2021) la publicación de artículos se ha mantenido constante, probablemente debido a las dificultades que conlleva implementar la inmovilización de enzimas en un proceso de baja productividad, haciendo que el enfoque se concentre en el uso y optimización de hidrólisis con alcalasas libres. Así pues, a fin de contar con información actualizada, el periodo de tiempo a evaluar será entre los años 2011 y 2021 (Figura 2B). Ahora bien, en lo que va del 2022 se han registrado 5 publicaciones, por lo que no es conveniente valorar con

certeza su productividad, pero teniendo en cuenta el comportamiento de la comunidad científica a través de los años, es posible que esta culmine con alrededor de 14 publicaciones.

La Figura 3 muestra el promedio total de citas de todos los artículos por año de publicación (impacto anual) y se calcula dividiendo el número total de citas por el número de artículos. Para el 2013 se alcanzó el punto máximo con más de 50 y ha descendido drásticamente hasta el último año a evaluar (2021). A pesar de que esto sugiere el aumento en la cantidad de bibliografía a consultar y al interés por investigar, no es una métrica para estimar el impacto de los autores o la revista, por lo que se le puede atribuir además a la relevancia de los avances producidos en cada año para referenciar otros estudios en años posteriores.

Finalmente, la Figura 4 trata de una relación entre las revistas y el número de artículos científicos publicados en ellas sobre el tema de interés. Esta indica que la mayoría de la producción científica se concentra principalmente en Food Chemistry, seguida de Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, Biocatalysis and Biotransformation y Methods in Molecular Biology. Los artículos de investigación pertenecientes a estas revistas se encuentran relacionados con reacciones químicas, reactores, industria alimentaria, bioquímica, compuestos bioactivos, catálisis, tecnología y enzimas, lo cual es congruente teniendo en cuenta que el objetivo de la búsqueda son estrategias de inmovilización de alcalasas para generar hidrolizados de proteína como suplemento alimenticio.

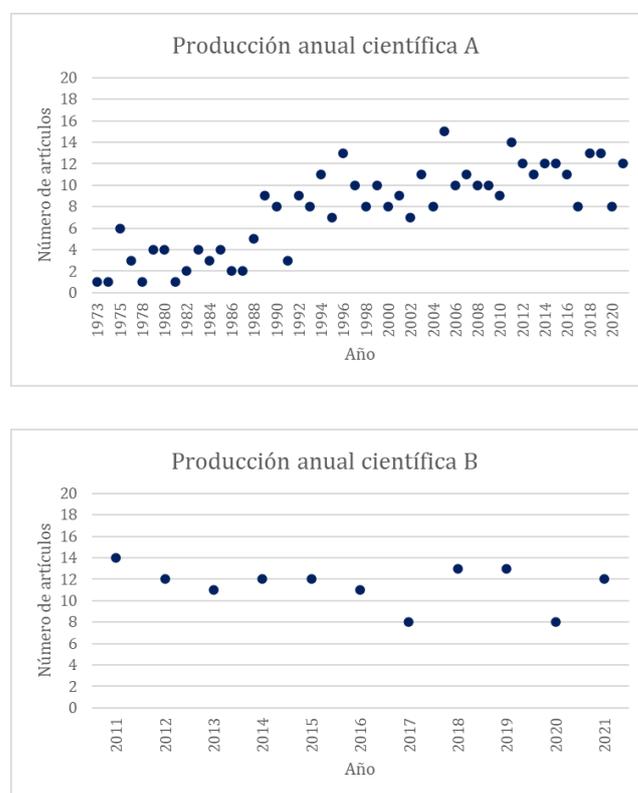


Figura 2. Producción anual científica. A: Corresponde a la producción anual científica entre 1973-2021. B: Corresponde a la producción anual científica de los últimos diez años.

Este análisis bibliométrico es una importante referencia para proporcionar una visión general de la evolución de la investigación e identificar posibles vacíos alrededor de metodologías de inmovilización de alcalasas. Según lo anterior descrito, se tomará la información disponible desde el 2011 para llevar a cabo una segunda filtración y reconocer los problemas, estrategias, progresos y recomendaciones que pudieron o no abordarse hasta el 2022 (a fin de dar robustez), utilizando artículos provenientes de otras bases de datos que apoyen el desarrollo de este proyecto.

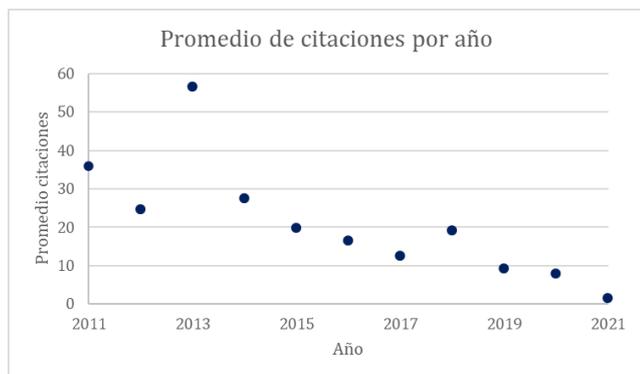


Figura 3. Promedio de citas por año.

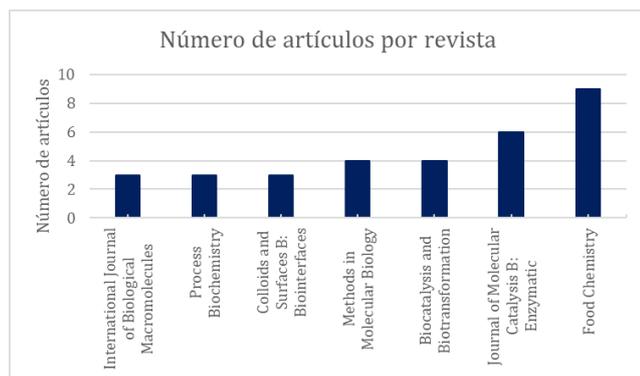


Figura 4. Número de artículos publicados por revista.

4.2. Selección de los artículos

La [Tabla 3](#) resume los resultados de la filtración bibliográfica con respecto a los criterios de selección previamente mencionados empleando

Tabla 3. Matriz comparativa de metodologías de inmovilización de Alcalas en diferentes materias primas.

Sustrato	Producto	Inmovilización	Condiciones de hidrólisis	Grado de hidrólisis	Actividad tras inmovilización	Actividad tras ciclos de reutilización	Referencia
Aislado de proteína de soja	Hidrolizado de proteína de soja	Partículas magnéticas de quitosano como soporte a través de reticulación de glutaraldehído	pH=9; T=50°C; t=140 min	18,38%	77,66%	86% en 10 ciclos	(Wang et al., 2014)
		Partículas de sílice mesoporosas modificadas con HMSS-3N-Ni2	pH=10; T=50°C; t=180 min	~22,5%	90%	75% en 5 ciclos	(Zhu et al., 2022)
		Microesferas de quitosano mediante extrusión electrostática	pH=8; T=50°C; t=200 min	15,00%	-	-	(Žuža et al., 2017)
		Perlas de alginato de calcio por UAD	pH=8; T=50°C; t=225 min	26,5%	-	~75% en 8 ciclos	(Jonović et al., 2021)
		Compuesto híbrido con hidrógeno fosfato de calcio	pH=8; T=50°C; t=120 min	~36%	-	85,4% en 7 ciclos	(Memon et al., 2019)
Aislado de proteína de colza	Hidrolizado de proteína de colza	Perlas de alginato de sodio asistidas con ultrasonido de doble frecuencia	pH=9,5; T=60°C; t=76 min	17,8%	~90%	-	(Wang et al., 2016)
Aislado de proteína de semillas de melinjo	Hidrolizado de semilla de melinjo con actividad antioxidante	Matrices sol-gel	pH=8; T=50°C; t=120 min	23%	-	~100% en 4 ciclos	(Siswoyo et al., 2017)

para este proyecto, 18 artículos en total: 17 entre los años 2011-2021 y uno de 2022. Es de aclarar que la eficiencia del proceso completo se determina mediante factores que indican una buena técnica de inmovilización como la actividad residual teniendo como referencia la actividad de la enzima libre y la actividad recuperada tras determinados ciclos de reutilización. A su vez, la naturaleza del sustrato y las condiciones de hidrólisis (pH, temperatura y tiempo) influyen en el grado de hidrólisis y, por ende, en las características del producto obtenido.

4.3. Materias primas y polipéptidos bioactivos

Es importante identificar y seleccionar las materias primas adecuadas para la obtención de hidrolizados, debido a que las actividades biológicas dependen principalmente de la disponibilidad de los péptidos en las proteínas. Por esto, es importante saber que las proteínas se clasifican según su forma (globulares o fibrosas) y su composición química (simples o conjugadas). Los sustratos vegetales y algunos animales se componen en su totalidad por proteínas globulares con un propósito funcional y son compactas/redondeadas debido a los múltiples dominios de plegamiento en las secuencias irregulares de aminoácidos. A diferencia de las fibrosas, son más sensibles a los cambios ambientales al contener grupos R complejos y estructura terciaria definida, con difícil acceso para las proteasas a sus enlaces peptídicos. A su vez, generalmente son solubles en agua a causa de la exposición de las cadenas laterales de aminoácidos hidrofílicos en la superficie de la proteína (Shen, 2019). Por otro lado, los sustratos complejos animales poseen proteínas fibrosas que proporcionan andamiaje y se componen de secuencias de aminoácidos altamente repetitivas formando hebras largas y estrechas a menudo insolubles en agua, con muy poca estructura terciaria que les confieren mayor resistencia frente al pH y la temperatura (Shen, 2019). Con respecto a la composición química, las proteínas pueden ser holoproteínas (proteínas simples) conformadas por solo cadenas de aminoácidos o heteroproteínas (proteínas conjugadas) compuestas por cadenas de aminoácidos unidas a grupos prostéticos. Las primeras pueden ser globulares (albúminas, globulinas, glutéinas, prolaminas, histonas, protaminas, hormonas y enzimas) o fibrosas (colagenosas, fibrinas, queratinas y elastinas). Por el

Harina de gluten de maíz	Hidrolizado de harina de gluten de maíz con actividad inhibitoria de ACE	Perlas de alginato de sodio asistidas con ultrasonido de triple frecuencia	pH=8,5; T=60°C; t=90 min	20.6%	19.1%	-	(Qu et al., 2018)
Aislado de proteína de suero	Hidrolizado de proteína de suero	Perlas de glioxil agarosa 4BCL	pH=8; T=60°C; t=180 min	22,20%	85%	~85% en 6 ciclos	(Pessato et al., 2016)
	Hidrolizado de proteína de suero	Perlas de sílice mesoporosas modificadas con HMSS-3N-Ni2	pH=10; T=50°C; t=180 min	~17,50%	90,00%	75% en 5 ciclos	(Zhu et al., 2022)
	Hidrolizado de proteína de suero con actividades antioxidantes y quelantes de hierro antimicrobianas	Perlas de glioxil-maíz-mazorca-polvo (AGCCP)	pH=9; T=50°C; t=24h-48h	26.59%	-	-	(Da Cruz et al., 2020)
	Hidrolizado de proteína de suero	Perlas de quitosano activadas con glutaraldehído	pH=9; T=50°C; t=30 min	9%	-	-	(Fenoglio et al., 2016)
Caseína	Hidrolizado de caseína	Perlas de glioxil agarosa CL modificadas con EDA y glutaraldehído	pH=9; T=45°C; t=180 min	-	85%	~100% en 6 ciclos	(Hussain et al., 2018)
	Hidrolizado de caseína	Perlas de glioxil agarosa activadas con glutaraldehído a baja fuerza ionica	pH=9; T=40°C; t=360 min	-	95%	~100% en 5 ciclos	(Ait Braham et al., 2018)
Proteína de clara de huevo		Microesferas de quitosano mediante extrusión electrostática	pH=8; T=50°C; t=200 min	30,28%	-	~90.65% en 5 ciclos	(Žuža et al., 2017)
	Hidrolizado de clara de huevo	Perlas magnéticas activadas con carbodiimida y funcionalizadas con carboxilo	pH=8; T=60°C; t=180 min	20,00%	-	55% tras 10 ciclos	(Yang et al., 2017)
		Perlas de alginato de calcio por UAD	pH=8; T=50°C; t=135 min	36,40%	-	-	(Jonović et al., 2021)
Proteína de gelatina de tilapia	Hidrolizado de gelatina de tilapia con actividad antioxidante	Perlas de quitosano activadas con glutaraldehído	pH=6; T=55°C; t=120 min	-	~100%	~62% en 3 ciclos	(Paiva-dos Santos et al., 2020)
Colágeno de piel de tilapia	Hidrolizado de colágeno con actividad antioxidante	Nanoesferas de poliestireno sulfonado	pH=6.5; T=37°C; t=120 min	-	77,30%	68,65% en 5 ciclos	(Ye et al., 2021)
Proteína de polvo de desechos avícolas	Hidrolizado de polvo de desechos avícolas	Piedra pomez	pH=8; T=55°C; t=150 min	4,10%	-	-	(Robotjazi et al., 2020)
Carne de pollo y tendones de pavo	Hidrolizado de carne de pollo y tendones de pavo	Partículas de sílice magnética activadas con glutaraldehído y funcionalizadas con ATMS, Jeffamina y quitosano	pH=7; T=42°C; t=180 min	-	87,39%	≤85% en 6 ciclos	(Glomm et al., 2021a)

contrario, las heteroproteínas son globulares y pueden ser glucoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas o cromoproteínas. Consecuentemente, los péptidos que se encuentran inactivos e inmersos en las proteínas exhiben propiedades funcionales determinadas por la secuencia de entre 2 y 20 aminoácidos una vez son liberados. Por ejemplo, los péptidos con actividad antioxidante presentan regularmente AA aromáticos como Tyr, Trp o Phe en las cadenas terminales y Cys, Glu y Gly al interior, debido a su capacidad para neutralizar radicales libres y los reactivos de oxígeno y nitrógeno y la actividad antihipertensiva o inhibidora de ACE, viene dada por Pro, Phe o Tyr en los C-terminal y Val o Ile en los N-terminal (Romero et al., 2022; Zheng et al., 2016). Los artículos de investigación que evalúan fuentes vegetales han reportado la generación de péptidos a partir de hidrólisis de

proteínas globulares con un amplio espectro de propiedades, en las que se destacan hipocolesterolémicas, hipotriglicéridémicas, antidiabéticas, anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes, entre otras. Además, se ha descubierto que la alcalasa es la mejor enzima para obtener hidrolizados antioxidantes a partir de proteínas vegetales por su amplia especificidad y preferencia por aminoácidos hidrofóbicos que actúan como donantes de hidrógeno. Dentro de estas, la soya (mayormente compuesta por glicinas y coglicinas) ha sido el sustrato más estudiado a través de los años, pues contiene todos los aminoácidos esenciales que se encuentran en las proteínas animales sin colesterol y con menos grasas saturadas, no obstante, las actuales investigaciones recomiendan seguir indagando en

las condiciones de proceso para mejorar el sabor de los hidrolizados y comprender sus mecanismos de acción (Chatterjee et al., 2018).

En cuanto a los sustratos de origen animal mediante el uso de alcalasas, las proteínas del suero han mostrado hidrolizados de bajo peso molecular con actividad antioxidante, mayormente. Además, proteínas del suero como la caseína se usa como sustrato estándar para los ensayos de actividades enzimáticas de proteasas, debido a que todas las que se conocen hidrolizan la caseína a tirosina sin necesidad de desnaturalización previa (Reimerdes & Klostermeyer, 1976). Por otra parte, los residuos industriales como fuentes de proteína han tomado relevancia por su transformación en compuestos funcionales y la disminución de problemas asociados con su disposición final y contaminación. Se ha evaluado la producción de péptidos bioactivos a partir de esquelones de pescado, cabezas, vísceras, escamas, músculo, piel, entre otros, por su alto contenido de colágeno y gelatina, siendo este último una forma hidrolizada parcial del primero. Estas proteínas se componen de una secuencia única de más del 80% de aminoácidos no-polares como la glicina alanina, valina y prolina que les confiere propiedades variadas, especialmente antioxidantes (Ghaly et al., 2013). Por ejemplo, entre muchos otros, se hidrolizaron con alcalasas subproductos de rodaballo, caballa de la India, sardinella, lenguado y tilapia en condiciones previamente optimizadas y obtuvieron perfiles peptídicos hidrofílicos de bajo peso molecular con actividades antioxidantes, antihipertensivas o inhibitoras de ACE (Vásquez et al., 2020; Gaikwad et al., 2021; Souissi et al., 2007; Viji et al., 2019; Roslan et al., 2014).

De manera similar, los desechos de la industria avícola como las cabezas, patas, vísceras, plumas, piel, huesos, sangre, etc., son ricos en colágeno, gelatina, elastina, fibrinógeno, trombina, glicosaminoglicanos, queratina, calcio, entre otros y se han obtenido propiedades especialmente antihipertensivas y antioxidantes, con el uso de alcalasas (Cheng et al., 2009; Yusop et al., 2016; Onuh et al., 2015; Nikolaev et al., 2016). Particularmente, los huesos de pollo se componen sobre todo de colágeno (cerca del 90%; ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), aunque también contienen músculo, tejido conectivo y grasa con proteínas no colágenas como la fibrina, elastina y osteocalcina (cuya función es la fijación del calcio) y presentan gran proporción de aminoácidos como Gly, Glu, Lys y Tyr, lo que los hace susceptibles de obtener péptidos con actividades antioxidantes y antihipertensivas (Cheng et al., 2009). No obstante, en comparación con la piel, las plumas y la sangre exhibe ~33% de menor contenido de proteína, sumado a que se trata de una estructura estable de enlaces cruzados de fibras contenidas en complejos de oseína-hidroxiapatita (Romero et al., 2022; Zhou et al., 2019).

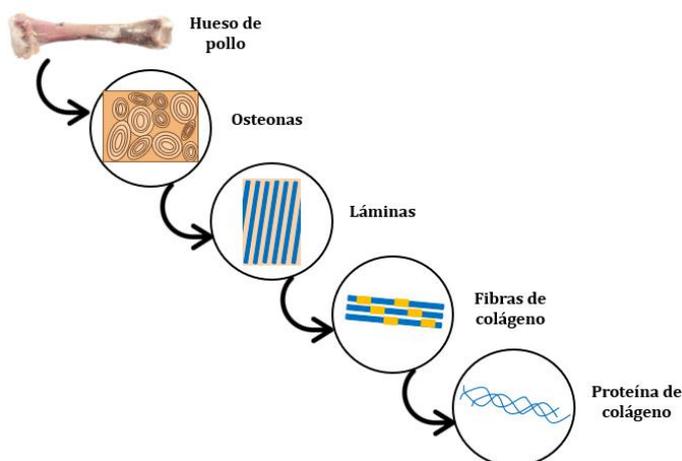


Figura 5. Esquema representativo de la composición de los huesos de pollo. Elaboración propia.

El grado de hidrólisis como parámetro de seguimiento de la proteólisis, consiste en la relación porcentual entre el número de enlaces peptídicos escindidos y el número total de enlaces disponibles. El porcentaje se encuentra determinado por condiciones como la concentración de enzima/sustrato, el tiempo de hidrólisis, el pH y la temperatura, así como de la naturaleza de la enzima (Rutherford, 2010). Teniendo como enfoque este último, la alcalasa inicia el ataque nucleofílico a través de un residuo

de serina en el sitio activo en una variedad de enlaces, generalmente en los extremos carboxilo de Phe, Trp, Tyr, Glu, Met, Leu, Ala, Ser y Lys por lo que los péptidos suelen ser de pequeño tamaño (Doucet et al., 2003). Debido a esto, se esperaría que el grado de hidrólisis fuera más alto, sin embargo, todas las fuentes exhiben porcentajes por debajo de 70% para alcalasas inmovilizadas (Tabla 3). Apartando por el momento las posibles causas relacionadas con los soportes de inmovilización e inhibición por producto, la hidrólisis parcial puede deberse principalmente a la complejidad de las matrices, especialmente las que contienen mezclas de proteínas globulares y fibrosas. La estructura única del hueso rodeado de tejido graso y las proteínas insolubles que las componen, dificultan el acceso al sitio activo de la alcalasa, resultando en un bajo grado y tasa de hidrólisis (Rifqi & Erwanto, 2020).

4.4. Aplicación de estrategias de inmovilización para la hidrólisis de huesos de pollo

Antes de llevar a cabo la hidrólisis enzimática, es importante someter el sustrato a un pretratamiento para que las proteínas se desnaturalicen y la alcalasa pueda acceder al enlace peptídico. Generalmente, dichos procedimientos consisten en hervir las materias primas, sin embargo, tiene un efecto limitado en la eliminación de grasa en los huesos de pollo y la inmersión a altas temperaturas aumenta la porosidad del colágeno causando posibles daños irreversibles. Otros tratamientos consisten en la desmineralización con ácidos y bases para retirar principalmente los fosfatos de calcio y la extracción por solventes para eliminar grasas adheridas, ambos con la desventaja del uso de productos químicos (Hosseini-Parvar et al., 2009; Zhang et al., 2010). Por ejemplo, Cansu & Boran, 2015, optimizaron el procedimiento de varios pasos que consistían en la limpieza de huesos de pollo en agua destilada a 65°C, desmineralizarlos en HCl al 2% y finalmente desengrasarlos en n-hexano a 25°C y logró conservarse más del 80% del colágeno inicial y se removieron 57.1% de las grasas y el 87.5% de los minerales, no obstante, recomiendan investigar más al respecto en relación con la calidad del producto. Por otro lado, Kijowsky & Niewiarowicz, 2007, recuperaron el 18% de la proteína total utilizando solución al 6% de NaCl + 0.015% NaNO₂ + 0.05% ascorbato. Demás ejemplos incluyen el secado a 60°C en deshidratador convectivo y congelación a -18°C, adición de HCl, NaOH y EDTA (para la descalcificación), etc. (Londoño et al., 2022; Duan et al., 2009). Estos procedimientos normalmente incluyen condiciones críticas, reactivos agresivos y equipos complicados, por lo que alternativas más sencillas y ecológicas como el uso de lipasas podrían hidrolizar específicamente enlaces éster de aceites/grasas y mejorar efectivamente el contenido de proteínas y superficie de las muestras de hueso (Yao et al., 2020). De este modo, sería interesante abordar en futuros estudios la influencia que tendría la hidrólisis acoplada de lipasa-alcalasa inmovilizada en el DH (grado de hidrólisis) en las proteínas de huesos de pollo.

En lo que respecta a la inmovilización de proteasas, las alcalasas han sido utilizadas en una variedad de materias primas tanto vegetales como animales y la mayoría de los estudios informan mejoras en el grado de hidrólisis, estabilidad térmica y operativa en comparación con el uso de enzimas libres. Teniendo en cuenta las investigaciones en la Tabla 3, parece ser que se presentan algunas tendencias en relación con los factores anteriormente mencionados. Por ejemplo, la curva de grado de hidrólisis para las alcalasas solubles generalmente exhibe un crecimiento hasta pasados ~100 min seguido de una constante, comportamiento que en algunos casos es similar una vez se inmovilizan las enzimas, producto de la inhibición a medida que se generan los péptidos, como en Jonović et al., 2021 (Valencia et al., 2014). Caso como el de Wang et al., 2014, solo se observa un aparente crecimiento una vez ha transcurrido el tiempo en el que es evidente la inhibición para la enzima libre, mientras que en Žuža et al., 2017, Fenoglio et al., 2016 y Robotjazi et al., 2020 los valores de DH se encuentran por debajo de los obtenidos para alcalasas libres. Por otro lado, en Zhu et al., 2022, Memon et al., 2019 y Yang et al., 2016 los DH fueron mayores para la enzima inmovilizada. Si bien la naturaleza de las proteínas influye en los resultados de dicha variable, la técnica de inmovilización provee estabilidad a la enzima para garantizar el contacto entre esta y los enlaces peptídicos del sustrato (los factores involucrados con el tipo de inmovilización se discutirán más adelante). Para todos los casos en la Tabla 3 se puede decir que la inmovilización proporciona a las alcalasas estabilidad térmica y operacional, siendo más resistentes a cambios

ambientales como el pH y la temperatura y manteniendo un porcentaje de la actividad residual (entre ~20 y 50% tras determinados ciclos de hidrólisis en comparación con las enzimas libres, a su vez, se resalta el hecho de que es posible reutilizarlas en una posterior hidrólisis con sustrato fresco o remanente.

Ahora, debido al tamaño de las proteínas presentes en estos residuos complejos, el acceso al centro activo de la enzima puede estar limitado por la orientación de la proteasa en la superficie del soporte, de manera que la estrategia adecuada debería permitir la máxima cobertura, la máxima actividad residual tras determinados ciclos de hidrólisis y que no induzca desnaturalización. En la literatura se han reportado estudios de alcalasas inmovilizadas en diversos soportes como perlas de sílice, acrílicas macroporosas, agarosa, alginato, quitosano, entre otros, mediadas por enlaces covalentes, entrecruzamiento, adsorción y quelación principalmente, no obstante, diferentes autores afirman que la unión covalente multipunto favorece tanto la estabilidad térmica, como la operativa y de almacenamiento de la enzima en comparación con su forma libre, pues le proporciona rigidez a la estructura terciaria (Dos Santos et al., 2015; Coríci et al., 2011; López et al., 2020; Mateo et al., 2007; Wang et al., 2014). Desde otro ángulo, en el universo de los soportes/matrices, la selección del material recae sobre una serie de ideales que la mayoría no posee, por lo que es de vital importancia identificar las ventajas y desventajas de cada uno para su aplicación en casos particulares. Dentro de estas propiedades se encuentran: debería ser de bajo impacto ambiental y económico, totalmente inerte después de la inmovilización, resistente térmica y mecánicamente, regenerativo, debería mejorar la especificidad de la enzima, retener la mayor cantidad de enzima y minimizar la hidrofobicidad de la superficie (Sirisha et al., 2016).

Tanto los soportes inorgánicos (sílice y piedra pómez) como los orgánicos (polisacáridos) son eficaces para la inmovilización de enzimas pues brindan rigidez y porosidad. Sin embargo, este último es crucial especialmente cuando los sustratos son de gran tamaño (como los huesos de pollo), pues un poro muy pequeño puede desencadenar obstáculos de difusión en el proceso de unión enzima-sustrato (E-S) y si es muy grande, es probable que se presente una considerable fuga de enzima y por ende una disminución en la eficiencia catalítica durante ciclos de hidrólisis continuos, aunque es más probable que se evite la autólisis (Jonović et al.,

2021). Por esto, la activación mediante enlaces covalentes es una forma de fortalecer la unión enzima-soporte, por lo que la transferencia de masa (enzima-sustrato) no suele verse limitada, pero existe el riesgo de que las condiciones de inmovilización ocasionen una orientación inadecuada o que después de cierto tiempo se genere un exceso de rigidez, así como cierta tensión estructural que desestabilice la estructura terciaria (Dos Santos et al., 2015; Tran et al., 2011). El objetivo de agentes activadores como el glutaraldehído, el gloxilo y la carbodiimida, consiste en acoplar o "ligar" la enzima con el soporte. Estos se han descrito como estabilizadores adecuados para llevar a cabo uniones covalentes multipunto, siendo el primero bastante reactivo con grupos amino terminales a pH neutro y el gloxilo y la carbodiimida con residuos de lisina generalmente a pH alcalinos y neutros (Okuda et al., 1991; Mateo et al., 2005; Kazenwadel et al., 2015).

Centrándose en las metodologías de inmovilización de alcalasas con el uso de proteínas vegetales, las técnicas empleadas por Wang et al., 2014 y Memon et al., 2018 fueron las que mejores resultados obtuvieron en términos de estabilidad operativa y grado de hidrólisis. En el estudio realizado por los primeros, lograron inmovilizar alcalasas en partículas magnéticas de quitosano activadas con glutaraldehído manteniendo una actividad residual del 86% tras 10 ciclos, probablemente debido a su fácil separación mediante una captura magnética sin necesidad de someter a estrés mecánico por centrifugación (Wang et al., 2014). Por otro lado, las alcalasas inmovilizadas en el compuesto híbrido con hidrógeno fosfato de calcio produjo un DH de aproximadamente 36%, resultado de un cambio destacable en la estructura de la enzima de conformación abierta, lo cual permitió que el sustrato se uniera mejor al sitio activo (Memon et al., 2019). Dichas estrategias suman valor para ejecutarse en un futuro con huesos de pollo como sustrato, sin embargo, no es posible asegurar comportamientos similares en la obtención de péptidos bioactivos debido a las diferencias en sus características fisicoquímicas. Otras técnicas como el uso de perlas de alginato de sodio y matrices sol-gel conllevan pasos relativamente sencillos y fáciles, no obstante, es probable que se presente degradación de los geles, baja resistencia mecánica y el tamaño de los poros desencadenen limitaciones en la transferencia de masa (Zhou et al., 2010, Bangrak et al., 2011; Kandimalla et al., 2006).

Tabla 4. Ventajas y desventajas de las técnicas de inmovilización de alcalasas utilizando proteínas animales complejas como sustrato. Elaboración propia.

	Quitosano-glutaraldehído	Poliestireno sulfonado	Piedra pómez	Sílice magnética
Ventajas	Técnica simple y económica	Técnica simple y económica	No requiere modificaciones	Mayor estabilidad operativa
	Enlace covalente fuerte	Gran área superficial	Alta carga de enzimas	Baja resistencia difusional
	No toxicidad	Gran carga de enzimas	Bajo riesgo de autólisis	Fácil recuperación
Desventajas	Gran disponibilidad de grupos amino	Pérdida mecánica gradual	Diámetro variable de poro	Requiere modificaciones
	Baja resistencia mecánica	Baja especificidad	Fuga de enzimas	Requiere atención con el núcleo magnético
	Posible exceso de rigidez	Pérdida de enzimas por enlaces débiles	Dificultades de difusión	Proceso más elaborado

Para efectos de comparación, el enfoque recae sobre aquellas metodologías de inmovilización que se implementan en sustratos complejos de origen animal, donde la naturaleza de sus proteínas insolubles pueden relacionarse con las presentes en los huesos de pollo, por lo que podría esperarse un comportamiento similar durante la hidrólisis enzimática. Dentro de estas se encuentran: el uso de perlas de quitosano activadas con glutaraldehído, perlas de poliestireno sulfonado, atrapamiento en piedra pómez y unión covalente en perlas de sílice magnética aminofuncionalizadas y activadas con glutaraldehído. Teniendo en cuenta los beneficios de la inmovilización en términos de estabilidad operativa, reciclabilidad y separación del medio final, la

Tabla 4 presenta algunas ventajas y desventajas de estas técnicas.

La unión covalente multipunto con el uso de perlas de quitosano activadas con glutaraldehído es una técnica ampliamente estudiada y aplicada con muchas otras enzimas y se caracteriza por ser un proceso económico, de baja toxicidad y proporciona enlaces fuertes debido a los múltiples sitios de acople que se encuentran dispersos por toda la superficie de la enzima (Figura 6). Sin embargo, se trata de una estrategia de baja resistencia mecánica tras la separación del catalizador y debido al gran contenido de grupos amino en el quitosano, el activador puede unirse a algunos residuos disponibles de la enzima que se encuentran muy cerca

del sitio activo, por lo que es posible que se presenten impedimentos estéricos, de difusión en el complejo E-S, así como exceso de rigidez en los enlaces (como pudo suceder con los resultados en Wang et al, 2014, Žuža et al, 2017 y Fenoglio et al, 2016) (Paiva-dos Santos et al., 2020). Por esto, esta técnica suele emplearse con sustratos pequeños como proteínas de clara de huevo y los resultados muestran valores de actividades residuales relativamente altas, por ejemplo, véase que con la hidrólisis de gelatina de tilapia se obtuvo cerca del 62% en 3 ciclos de reutilización, en comparación con 90.65% tras 5 ciclos utilizando proteína de clara de huevo.

De manera similar, a pesar de que el uso de perlas de glioxil-agarosa ofrece gran estabilidad debido al establecimiento de enlaces amino débiles y reversibles con las zonas más reactivas de la enzima, las uniones multipunto son menos intensas que las del glutaraldehído, debido a que este activador se une a residuos Lys de la enzima y la alcalasa no posee una alta concentración de estos (Mateo et al., 2005). Los pocos Lys presentes en la superficie de la enzima se encuentran cercanos al sitio activo y si bien no son tantos comparados con los del glutaraldehído, es probable que la reacción se vea parcialmente limitada por el acceso al sustrato, por lo que también suele utilizarse con sustratos más pequeños como las proteínas de suero y la caseína en Pessato et al, 2016, Da Cruz et al, 2020, Hussain et al, 2018 y Ait Braham et al, 2018 (véase Tabla 3). Adicionalmente, otros autores que inmovilizaron proteasas sobre glioxil-agarosa, informaron un efecto negativo similar sobre la estabilidad de la enzima, que podría estar asociado a cambios conformacionales (Braham et al., 2021).

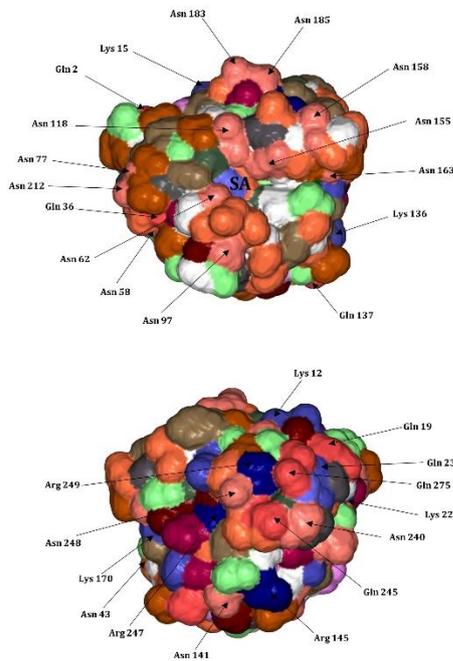


Figura 6. Representación de los residuos de la alcalasa con los que el glutaraldehído podría reaccionar. SA: Sitio activo. Tomado y adaptado de Paiva-dos Santos et al, 2020. La estructura 3D se obtuvo de Protein Data Bank, código PDB 1SBC de Neidhart, D.J. & Petsko, G.A. (1988).

En relación con los materiales porosos para el atrapamiento de alcalasas, las matrices sol-gel y las perlas de alginato son las técnicas más comunes. Estas se caracterizan por simplicidad de preparación, fácil inmovilización, inercia química y porosidad controlada, pero poseen baja estabilidad, la alta porosidad puede desencadenar una rápida disminución en la eficiencia como consecuencia de la fuga de la enzima (Kandimalla et al., 2006; Damayanti et al., 2021; Jonović et al., 2021). Algunos ejemplos han logrado optimizar la estrategia de inmovilización y de hidrólisis a partir de perlas de alginato utilizando pulverización ultrasónica con secado y ultrasonido asistido y los resultados reportan mejoras en las actividades residuales, no obstante, no lo suficientemente altas comparadas con otras técnicas de inmovilización (~20% tras 180 min para el estudio realizado por Qu et al, 2018) y una baja velocidad de reacción (DH) (en Jonović et al, 2021 y Wang et al, 2016). De manera similar, en Siswoyo et al, 2017 se hidrolizó proteína de semillas de melinjo y tras 4 ciclos de reutilización la actividad se redujo un 50%, producto de las posibles causas mencionadas

anteriormente. Ahora, el uso piedra pómez es una alternativa novedosa y económica, pero se sugiere estudiar más al respecto y optimizar las condiciones a fin de maximizar la actividad enzimática y el grado de hidrólisis utilizando desechos avícolas como materia prima. La alta porosidad de estos materiales pueden proporcionar una adecuada inmovilización y alta carga enzimática, cuyos impedimentos estéricos son poco probables, los sustratos y productos circulan libremente y el riesgo por autólisis disminuya debido a que las enzimas no están lo suficientemente cerca como para interactuar entre sí (Glomm et al., 2021a). Sin embargo, no es posible controlar el tamaño del poro, por lo que las enzimas pueden fugarse o las proteínas/péptidos apiñarse por intentar ingresar o liberarse al medio. Tal es el caso de Robatjazi et al, 2021, en cuya investigación lograron hidrolizar polvo de desechos avícolas con alcalasa libre e inmovilizada con flujo constante de sustrato y los valores de grado de hidrólisis resultantes corresponden a 16 y 4% respectivamente.

Ye et al, 2021 inmovilizaron alcalasas por adsorción en perlas de poliestireno sulfonado de síntesis escalable para obtener péptidos con actividad antioxidante a partir de colágeno de piel de tilapia y concluyen que se trata de una estrategia fácil y eficiente que podría mantener la actividad enzimática intacta y una estabilidad a pH y temperaturas superiores. Lo anterior se debe a que el poliestireno presenta ventajas como la inercia química, es más barato que la mayoría de otros polímeros sintéticos, no es tóxico, brinda rigidez mecánica y mayor área de superficie, además, es posible que la adsorción se beneficie por la interacción sinérgica de la interfaz hidrofóbica y enlaces de hidrógeno (Ye et al., 2021; Al-Sabagh et al., 2017). Pero tiene limitantes como la baja especificidad de unión y pérdida mecánica gradual. La actividad enzimática residual se encuentra por debajo del 80% en el primer ciclo y por debajo del 70% tras el quinto (Tabla 3), posiblemente a causa de la pérdida de material durante cada proceso.

Finalmente, una estrategia potencialmente funcional para la hidrólisis de huesos de pollo, es el uso de perlas de sílice magnéticas, ya que son estructuras nanométricas de gran área superficial y alta estabilidad térmica y mecánica, aunque se trata de un proceso de cuidado y más elaborado ya que requiere recubrir, aminofuncionalizar y activar las partículas magnéticas (Sirisha et al., 2016). Por ejemplo, en el estudio de Glomm et al, 2021a se lleva a cabo la hidrólisis de tendones de pavo y músculo de pollo en partículas de sílice magnéticas utilizando diferentes amino-funcionalizadores (ATMS, jeffamina y quitosano) y concluyeron que con el recubrimiento de ATMS se obtenía la mayor concentración de grupos amino en la superficie y por ende se unían más a la alcalasa en comparación con el quitosano y la jeffamina. Sin embargo, se obtuvo mayor aumento en la actividad enzimática y péptidos con menor peso molecular utilizando jeffamina, posible resultado de las cadenas flexibles que ejercían mejor movilidad de las alcalasas y seguramente disminuía el riesgo por autólisis (Glomm et al., 2021a). En términos de comparación, con las otras estrategias empleadas con sustratos complejos de origen animal, se conservó mejor la actividad enzimática tras 6 ciclos consecutivos con alrededor de 78%, a diferencia de 68.65% tras 5 ciclos consecutivos en Ye et al, 2021 y 62% tras solo 3 ciclos en Paiva-dos Santos et al, 2020. A su vez, teniendo en cuenta que la naturaleza de los péptidos bioactivos es ser de bajo peso molecular para una mejor absorción, los hidrolizados con capacidad antioxidante de Glomm et al, 2021a estuvieron alrededor de 798 Da inclusive tras 4 ciclos, mientras que Ye et al, 2021 entre 700 y 3000 Da en un solo ciclo. Esto es importante, porque lo más común es que debido a la disminución en la tasa de hidrólisis a través del tiempo, también lo haga la escisión en los enlaces peptídicos de la proteína y por ende la presencia de hidrolizados con actividades biológicas (Ye et al., 2021). Además, tras 25 meses de almacenamiento utilizando las partículas de sílice se puede conservar hasta el 93% de la actividad enzimática inicial, un valor bastante llamativo considerando la estabilidad operativa a largo plazo. Por último, se destaca la importancia del uso de partículas magnéticas como estrategia de inmovilización enzimática, ya que facilitaría los procesos de mezclado y separación una vez se hayan ejecutado los ciclos de hidrólisis. Es decir, solo bastaría con la aplicación de campos magnéticos oscilantes y una captura para retirar las enzimas sin necesidad de centrifugación y múltiples lavados en contraste con otras metodologías (Kazenwadel et al., 2015; Glomm et al., 2021a). El esquema del proceso llevado a cabo para inmovilizar alcalasas en partículas de sílice magnética se muestra en la **Error! No se encuentra el origen de la**

referencia. Además, partiendo de la suposición de que los péptidos obtenidos de bajo peso molecular se atribuyen al “fácil” acceso del sustrato y por ende un posible mayor grado de hidrólisis, un cambio en la estructura secundaria de la de la alcalasa puede ser una de las causales. De esta manera, es razonable que se produzca una disminución de contenido de hélices α (en magenta, ver [Error! No se encuentra el origen de la referencia.](#)) en comparación con la enzima libre acompañado de una reducción en la actividad enzimática (Giannakopoulou et al., 2021). A su vez, las cadenas flexibles de la jeffamina probablemente permitieron que la movilidad de las enzimas aumentara haciendo que los sitios activos estuvieran mejor y más disponibles para el sustrato con la unión covalente multipunto a través de la activación con glutaraldehído (Figura 6) (Glomm et al., 2021a).

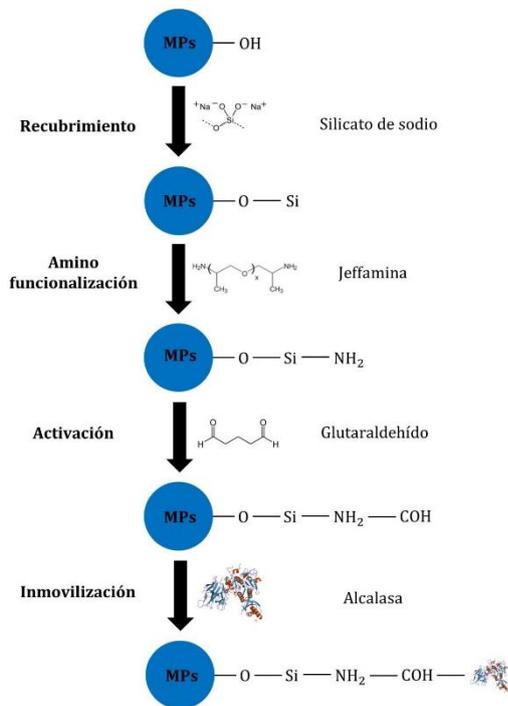


Figura 7. Esquema de inmovilización a partir de partículas de sílice magnéticas. MPs: partículas magnéticas. Elaboración propia.

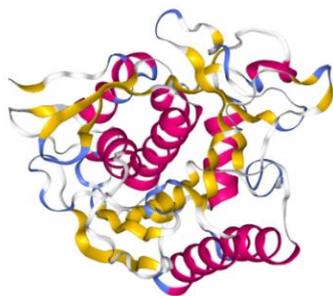


Figura 8. Estructura secundaria de la alcalasa. Magenta: hélices alfa, Amarillo: láminas beta; Blanco: espirales, Azul: giros beta. La estructura 3D se obtuvo de Protein Data Bank, código PDB 1SBC de Neidhart, D.J. & Petsko, G.A. (1988).

De igual importancia, las condiciones ambientales de operación en la hidrólisis como el pH y la temperatura influyen significativamente en la actividad y la velocidad de reacción de las alcalasas. El pH contribuye al plegamiento de la enzima manteniendo su estructura, la carga y forma de los aminoácidos y del sitio activo. A pesar de que las alcalasas funcionan a pH moderadamente alcalinos (entre 7-10) un cambio en el valor óptimo disminuirá la actividad y evitará que el sustrato se una al sitio activo de la enzima, siendo los medios ácidos los de mayor impacto (Novozymes, s.f). Por otro lado, la eficiencia catalítica sostiene una relación directamente proporcional con la temperatura, sin embargo, cuando sobrepasa el rango óptimo (30-65°C) existe el riesgo por desnaturalización irreversible alterando la forma del sitio activo y con ello la disminución en la actividad enzimática y la velocidad de reacción (Novozymes, s.f). En el caso contrario, si se mantiene por debajo es posible que no haya suficiente energía para que

la enzima reaccione con las proteínas. Ahora, si bien los soportes de inmovilización pueden proveer a las alcalasas resistencia frente a intervalos más amplios de estas condiciones en comparación con su forma libre, los puntos óptimos no son significativamente diferentes. Una variedad de estudios con alcalasas libres e inmovilizadas, indica que los valores óptimos de pH y temperatura para la hidrólisis de proteínas tanto vegetales como animales, generalmente oscilan entre 7-10 y 50-60°C, lo cual corresponde con los resultados presentados en la Tabla 3. Por ejemplo, Ye et al, 2021 hidrolizaron colágeno de gelatina de tilapia y determinaron que a pH 6.5 y 37°C se mantenía la máxima actividad y la enzima cargada al soporte. De manera similar, Wang et al, 2014 concluyeron que a pH 9 y a 50°C se obtuvo cerca del 98% de la actividad relativa utilizando enzimas libres e inmovilizadas en partículas magnéticas de quitosano para producir péptidos a partir de aislado proteínico de soja. Además, Fenoglio et al, 2016 expresaron que a pH 10 y 50°C se obtenía aproximadamente el mismo porcentaje de grado de hidrólisis (~9%) para ambos casos en proteínas de suero de leche. Particularmente, en la hidrólisis de huesos de pollo con alcalasas libres se han empleado condiciones de pH de 8-9 y temperaturas de 50-55°C (Cheng et al., 2009; Cheng et al., 2008; Londoño et al., 2022; Teshnizi et al., 2020). Para el caso de enzimas inmovilizadas no hay investigaciones que indiquen el uso exclusivo de huesos de pollo, no obstante, algunas reportan la hidrólisis de mezclas de subproductos de la industria avícola y tendones de pavo a pH 8 a 55°C y pH 7 y 42°C (Robotjazi et al., 2020; Glomm et al., 2021). En este orden de ideas, los resultados sugieren mantener los rangos para pH y temperatura de 7-10 y 50-55°C a fin de maximizar la actividad de la proteasa, favorecer la velocidad de reacción, la unión enzima-sustrato, el grado de hidrólisis y disminuir la tasa de desactivación por exposición a altas temperaturas.

Otro parámetro para considerar es el tiempo, ya que tiene un efecto significativo en el grado de hidrólisis. Aunque este último se consigue a un tiempo mayor, en algún instante la velocidad de reacción disminuye y por lo tanto la actividad enzimática. Esto se debe probablemente a efectos estéricos entre la enzima y el sustrato, limitaciones en la difusión, desprendimiento de la enzima, cambios estructurales por los soportes de inmovilización, disminución de los enlaces peptídicos disponibles, inhibición por producto o desactivación enzimática (Paiva-dos Santos et al., 2020; Salwanee et al., 2013). Por otro lado, si el tiempo no es suficiente la reacción se acortará, de modo que se obtendrán grados de hidrólisis más bajos. Los valores más altos obtenidos o la máxima actividad enzimática se alcanzan alrededor de los 90-180 min (Tabla 3), lo cual es oportuno según estudios realizados para la hidrólisis de huesos de pollo, como en Londoño et al, 2022 que el proceso se llevó a cabo en 120 min. No obstante, dichos tiempos varían e incluso se han obtenido mayor porcentaje de actividad antioxidante e hipertensiva en 12 h (Cheng et al., 2008). Igualmente, es importante tener en cuenta la relación enzima-sustrato para llevar a cabo la hidrólisis de huesos de pollo. Al aumentar la concentración de sustrato mejora el área de contacto entre el sustrato y la enzima, por lo que la eficiencia aumenta, pero la tasa de hidrólisis disminuye a través del tiempo por la posible formación de péptidos que actúan como inhibidores (Deng et al., 2018). A altas concentraciones de enzima, además de desperdiciarse, lo más probable es que estas no puedan girar libremente y debido a la cercanía con otras, se genere autólisis. Por el contrario, a muy poca concentración las enzimas escindirían los enlaces peptídicos más susceptibles y la tasa de hidrólisis sería más lenta (O'meara et al., 1984). En la literatura se han reportado relaciones entre ~0.2 y 4% (Quaglia et al., 1987; Awuor et al., 2017).

Todos los factores anteriormente mencionados influyen en la reacción enzimática, pues de estos depende la calidad de los péptidos obtenidos. Si bien es común que la curva de hidrólisis presente un comportamiento típico cuya velocidad inicial es mayor y disminuye a través del tiempo, parámetros como la concentración de sustrato o la inactivación térmica no explican por completo lo que allí sucede. En su estudio, Valencia et al, 2014 indica que la inhibición por producto es la principal causa de la curvatura típica de hidrólisis y se puede explicar debido a los bajos valores en las constantes de inhibición, lo que da como resultado uniones indeseadas de péptidos al centro activo de la enzima. A pesar de que la mayoría de los procesos de hidrólisis de proteínas se realiza en lotes por el uso de enzimas solubles, la implementación de sistemas de lotes repetidos con enzimas inmovilizadas es una alternativa, ya que es posible recuperar el biocatalizador del medio. De esta manera, no se acumularían los péptidos y es probable que se presente un aumento de la actividad enzimática y el

grado de hidrólisis, así como la disminución en tiempo y costos asociados (Khanpanuek et al., 2021).

Por esto, la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** presenta una propuesta y/o un panorama general de lo que podría llevarse a cabo empleando partículas de sílice magnética como técnica de inmovilización de alcalasas para la hidrólisis de huesos de pollo, así como un pretratamiento de estos. Inicialmente, las condiciones de hidrólisis documentadas en Glomm et al, 2021a, exponen un proceso a 47°C, pH 7 y 3 h, siendo la temperatura un valor límite en el intervalo de operación

óptimo de la alcalasa, de manera que se plantea la opción de ejecutar a >50°C suponiendo que los resultados de actividad y grado de hidrólisis pudiesen mejorar. El tiempo de 2 h es un promedio aproximado en lo que normalmente transcurre una hidrólisis enzimática hasta que se presenta una inhibición por producto o una constante en la curva de DH. Finalmente, en lo que respecta al pretratamiento de la materia prima, la serie de lavados con distintas soluciones y el secado/molienda sugerirían una mejor disponibilidad de los enlaces peptídicos para la proteasa.

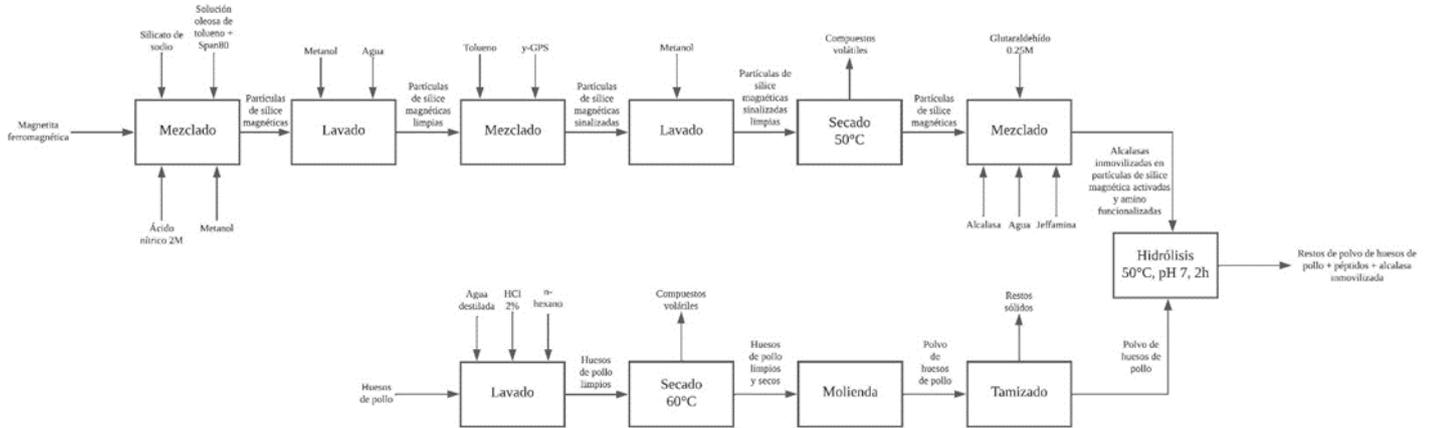


Figura 9. Procesamiento general para la hidrólisis de huesos de pollo mediante el uso de alcalasas inmovilizadas. Elaboración propia.

Por lo demás, sería interesante desarrollar en un futuro procedimientos experimentales apropiados para evaluar la influencia de la estrategia de inmovilización y las condiciones de hidrólisis sobre el DH en huesos de pollo y la calidad de los péptidos obtenidos, dado que la información actualmente disponible se orienta hacia la optimización en las condiciones de inmovilización y la actividad enzimática utilizando alcalasas. A su vez, sería útil llevar a cabo un análisis técnico-económico que permita comprender la magnitud del proceso y lo que conllevaría su ejecución a largo plazo y, por último, sería importante realizar un diseño de experimentos que permita estimar la influencia de otras estrategias de inmovilización en condiciones estándar para la obtención de polipéptidos bioactivos a fin de que los resultados puedan compararse en su totalidad.

4.5. Desafíos y oportunidades

Establecer y por lo tanto ejecutar un proceso enzimático a nivel de laboratorio conlleva una serie de elementos por revisar detenidamente y mucho más si considera llevar a una mayor escala. La industria avícola en la actualidad no cuenta con un procesamiento efectivo de los residuos sólidos y difícilmente se indaga en soluciones alternativas que mitiguen los problemas asociados con la generación en masa de desechos sólidos como los huesos de pollo. El control minucioso de las condiciones y por ende el escalamiento, figuran como factores que se limitan a los costos de inversión por los soportes de inmovilización, el catalizador, tiempo, etc., por lo que sigue siendo un reto llevar la hidrólisis enzimática a las grandes industrias. Sin embargo, la innovación y el desarrollo tecnológico dirigidos hacia una economía sostenible implicaría una mayor cantidad de bienes y servicios con menos recursos, por lo que es importante validar y optimizar procesamientos a escala de laboratorio que ayuden a estructurar y encaminar este tipo de proyectos.

4.6. Conclusiones

Los resultados de esta revisión sugieren que la estrategia de inmovilización más adecuada para la obtención de péptidos bioactivos a partir de huesos de pollo es la unión covalente multipunto con partículas de sílice magnéticas, debido que presenta buena estabilidad operativa, se obtienen péptidos de bajo peso molecular y los problemas por difusión son reducidos. Por otra parte, es posible la obtención de péptidos con las mismas bioactividades tanto en fuentes vegetales como animales, por lo que los huesos de pollo son una materia prima con potencial en la obtención de péptidos antioxidantes y antihipertensivos por su gran contenido de colágeno tipo I. A su vez, se destaca que la obtención de

polipéptidos bioactivos conlleva una serie de factores para tener en cuenta alrededor de la estrategia de inmovilización y el proceso de hidrólisis, así que no es adecuado inferir su comportamiento desde un solo punto de vista. A saber, las condiciones más adecuadas para llevar a cabo la hidrólisis enzimática son pH 7-10, temperatura entre 50-55°C y tiempo de 90-180 min. Finalmente, aunque la hidrólisis con enzimas solubles normalmente se realiza por lotes, los sistemas de lote repetido tienen potencial para disminuir tiempo y costos pues la inmovilización permite separar y reutilizar el catalizador. Se recomienda hacer estudios que evalúen de manera efectiva la influencia de otras metodologías y las condiciones de inmovilización de alcalasas sobre el grado de hidrólisis en huesos de pollo, así como un análisis técnico-económico que permita comprender la magnitud de este tipo de proyectos.

Contribuciones de autor

A.M Bermeo fue responsable del contenido de este artículo y la redacción del mismo. A.N Benavides participó en la revisión de este artículo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Icesi por proporcionar las bases de datos para la búsqueda de bibliografía.

Conflicto de intereses

El(los) autor(es) no declararon ningún conflicto de intereses.

Referencias

Ait Braham, S., Hussain, F., Morellon-Sterling, R., Kamal, S., Kornecki, J. F., Barbosa, O., ... Fernandez-Lafuente, R. (2018). Cooperativity of Covalent Attachment and Ion Exchange on Alcalase Immobilization Using Glutaraldehyde Chemistry: Enzyme Stabilization and Improved Proteolytic Activity. *Biotechnology Progress*. doi:10.1002/btpr.2768

Al-Sabagh, A. M., Moustafa, Y. M., Hamdy, A., Killa, H. M., Ghanem, R. T. M., & Morsi, R. E. (2017). Preparation and characterization of sulfonated polystyrene/magnetite nanocomposites for organic dye adsorption. *Egyptian Journal of Petroleum*. doi:10.1016/j.ejpe.2017.07.004

Arévalo Bohórquez, v. d. (2014a). Perspectiva de la producción avícola en Colombia. *Universidad Militar Nueva Granada*, 148, 148–162

- Awuor, O. L., Edward Kirwa, M., Betty, M., & Jackim, M. F. (2017). Optimization of Alcalase hydrolysis conditions for production of Dagaa (*Rastrineobola argentea*) Protein hydrolysate with antioxidative properties. *Industrial Chemistry*, 03(01), 1–6. <https://doi.org/10.4172/2469-9764.1000122>
- Bangrak, Phoowit & Limtong, Savitree & Phisalaphong, Muenduen. (2011). Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carrier. *Brazilian journal of microbiology: publication of the Brazilian Society for Microbiology*. 42. 676-84. doi:10.1590/S1517-838220110002000032
- Basso, A., & Serban, S. (2019). Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, 479, 110607. <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>
- Braham, S. A., Morellon-Sterling, R., de Andrades, D., Rodrigues, R. C., Siar, E.-H., Aksas, A., ... Fernandez-Lafuente, R. (2021). Effect of Tris Buffer in the Intensity of the Multipoint Covalent Immobilization of Enzymes in Glyoxyl- Agarose Beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(9), 2843–2857. doi:10.1007/s12010-021-03570-4
- Cansu, Ü., & Boran, G. (2015). Optimization of a Multi-Step Procedure for Isolation of Chicken Bone Collagen. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(4), 431. <https://doi.org/10.5851/KOSFA.2015.35.4.431>
- Cao, L. (2011). Immobilized Enzymes. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 2, 461–476. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00168-9>
- Chakraborty, S., Rusli, H., Nath, A., Sikder, J., Bhattacharjee, C., Curcio, S., & Drioli, E. (2016a). Immobilized biocatalytic process development and potential application in membrane separation: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(1), 43–48. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923373>
- Chatterjee, C., Gleddie, S., & Xiao, C.-W. (2018). Soybean Bioactive Peptides and Their Functional Properties. *Nutrients*, 10(9), 1211. doi:10.3390/nu10091211
- Cheng, F. Y., Wan, T. C., Liu, Y. T., Lai, K. M., Lin, L. C., & Sakata, R. (2008). A study of in vivo antihypertensive properties of enzymatic hydrolysate from chicken leg bone protein. *Animal Science Journal*, 79(5), 614–619. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2008.00571.x>
- Cheng, F. Y., Wan, T. C., Liu, Y. T., Chen, C. M., Lin, L. C., & Sakata, R. (2009). Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*, 80(1), 91–97. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2008.00601.x>
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Rouphael, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.SCIENTA.2015.08.037>
- Corfci, L. N., Frissen, A. E., van Zoelen, D.-J., Eggen, I. F., Peter, F., Davidescu, C. M., & Boeriu, C. G. (2011). Sol-gel immobilization of Alcalase from *Bacillus licheniformis* for application in the synthesis of C-terminal peptide amides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 73(1-4), 90–97. doi:10.1016/j.molcatb.2011.08.004
- Da Cruz, C. Z. P., de Mendonça, R. J., Guimaraes, L. H. S., dos Santos Ramos, M. A., Garrido, S. S., de Paula, A. V., ... Massolini, G. (2020). Assessment of the Bioactive Potential of Cheese Whey Protein Hydrolysates Using Immobilized Alcalase. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1007/s11947-020-02552-4
- Damayanti, A., Kumoro, A. C., & Bahlawan, Z. A. S. (2021). Review Calcium Alginate Beads as Immobilizing Matrix of Functional Cells: Extrusion Dripping Method, Characteristics, and Application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1053(1), 012017. doi:10.1088/1757-899x/1053/1/012017
- Deng, Y., Butré, C. I., & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, 86, 39–48. doi:10.1016/j.idairyj.2018.06.018
- Dos Santos, J. C. S., Rueda, N., Torres, R., Barbosa, O., Gonçalves, L. R. B., & Fernandez-Lafuente, R. (2015). Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. *Process Biochemistry*, 50(6), 918–927. doi:10.1016/j.procbio.2015.03.018
- Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F., & Foegeding, E. A. (2003). Enzyme-Induced Gelation of Extensively Hydrolyzed Whey Proteins by Alcalase: Peptide Identification and Determination of Enzyme Specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6300–6308. doi:10.1021/jf026242v
- Eş, I., Vieira, J. D. G., & Amaral, A. C. (2015a). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(5), 2065–2082. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6390-y>
- Federación Nacional de, & Avicultores de Colombia, F. (2018). *Federación Nacional de Avicultores de Colombia-Fenavi*. 260, 6. www.fenavi.org
- Fenoglio, Cecilia & Vierling, Noelia & Manzo, Ricardo & Roberto Julio, Ceruti & Sihufe, Guillermo & Mammarella, Enrique. (2016). Whey Protein Hydrolysis with Free and Immobilized Alcalase®: Effects of Operating Parameters on the Modulation of Peptide Profiles Obtained. *American Journal of Food Technology*. 11. 152-158. 10.3923/ajft.2016.152.158
- Gaikwad, S.B., More, P.R., Sonawane, S.K. et al. Antioxidant and Anti-hypertensive Bioactive Peptides from Indian Mackerel Fish Waste. *Int J Pept Res Ther* 27, 2671–2684 (2021). <https://doi.org/10.1007/s10989-021-10282-0>
- Ghaly, A.E. & vasudevan ramakrishnan, Vegneshwaran & Brooks, M.S. & Budge, S.M. & Dave, Deepika. (2013). Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 5. 107-129. 10.4172/1948-5948.1000110
- Giannakopoulou, A., Chatzikonstantinou, A. V., Chalmpes, N., Tsapara, G., Gournis, D., Polydera, A. C., & Stamatis, H. (2021). Development of a Novel Bi-Enzymatic Nanobiocatalyst for the Efficient Bioconversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol. *Catalysts*, 11(6), 749. doi:10.3390/catal11060749
- Glomm, W. R., Wubshet, S. G., Lindberg, D., Dankel, K. R., Afseth, N. K., Stenstad, P. M., & Johnsen, H. (2021a). Immobilized protease on magnetic particles for enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products. *Lwt*, 152(August), 112327. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112327>
- Górecka, E., & Jastrzębska, M. (2011). Immobilization techniques and biopolymer carriers. *Biotechnology and Food Science*, Vol. 75(nr 1), 65–86
- Guisan, J. M. (2013a). Immobilization of Enzymes and Cells IN Series Editor. *Immobilization of Enzymes and Cells*, 1051, 1–375. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7>
- Hassan, M. E., Yang, Q., Xiao, Z., Liu, L., Wang, N., Cui, X., & Yang, L. (2019a). Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. 3 *Biotech*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1969-0>
- Hosseini-Parvar S. H., Keramat J., Kadivar M., Khanipour E., Motamedzadegan A. Optimising conditions for enzymatic extraction of edible gelatin from the cattle bones using response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Tech.* (2009);44:467–475. doi: 10.1111/j.1365-2621.2008.01745.x

- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G., & Wu, G. (2017a). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0153-9>
- Hussain, F., Arana-Peña, S., Morellon-Sterling, R., Barbosa, O., Ait Braham, S., Kamal, S., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Further Stabilization of Alcalase Immobilized on Glyoxyl Supports: Amination Plus Modification with Glutaraldehyde. *Molecules*, 23(12), 3188. doi:10.3390/molecules23123188
- Jonović, M., Žuža, M., Đorđević, V., Šekuljica, N., Miličević, M., Jugović, B., Knežević-Jugović, Z. (2021). Immobilized Alcalase on Micron- and Submicron-Sized Alginate Beads as a Potential Biocatalyst for Hydrolysis of Food Proteins. *Catalysts*, 11(3), 305. doi:10.3390/catal11030305
- Kader, S., Jusoh, M., & Zakaria, Z. (2021). Palm fatty acid distillate-based biodiesel with sulfonated chicken and cow bone catalyst. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.09.217>
- Kandimalla, V. B., Tripathi, V. S., & Ju, H. (2006). Immobilization of Biomolecules in Sol-Gels: Biological and Analytical Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36(2), 73–106. doi:10.1080/10408340600713652
- Kazenwadel, F., Wagner, H., Rapp, B. E., & Franzreb, M. (2015). Optimization of enzyme immobilization on magnetic microparticles using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) as a crosslinking agent. *Analytical Methods*, 7(24), 10291–10298. doi:10.1039/c5ay02670a
- Kasim, N. Z., Abd Malek, N. A. A., Anuwar, N. S. H., & Hamid, N. H. (2020). Adsorptive removal of phosphate from aqueous solution using waste chicken bone and waste cockle shell. *Materials Today: Proceedings*, 31, A1–A5
- Khanpanuek, Siriwan & Lunprom, Siriporn & Reungsang, Alissara & Salakkam, Apilak. (2021). Repeated-batch simultaneous saccharification and fermentation of cassava pulp for ethanol production using amylases and *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on bacterial cellulose. *Biochemical Engineering Journal*. 177. 108258. 10.1016/j.bej.2021.108258
- Kijowski, J., & Niewiarowicz, A. (2007). A method of protein extraction from chicken bone residue and the chemical and electrophoretic characteristics of the extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 20(1), 43–49. doi:10.1111/j.1365-2621.1985.tb01901.x
- Kouachi. (2012). Potential applications of Chitosan Nanoparticles as novel support in enzyme immobilization. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 8(4), 203–219. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2012.203.219>
- Krishnamoorthi S, Banerjee A, Roychoudhury A. Immobilized Enzyme Technology: Potentiality and Prospects. *J Enzymol Metabol*. 2015;1(1): 104
- Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2018). Nanobiodevices for electrochemical biosensing of pharmaceuticals. *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs: From Design to Applications*, 291–330. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813665-2.00008-9>
- Kuswandi, B. (2014b). Recent progress in alcohol biosensors. *OA Alcohol*, 2(1), 1–8
- Lafarga, T., Álvarez, C., & Hayes, M. (2017). Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. *Journal of Food Biochemistry*, 41(6), e12418. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12418>
- Lemes, A. C., Sala, L., Ores, J. D. C., Braga, A. R. C., Egea, M. B., & Fernandes, K. F. (2016). A review of the latest advances in encrypted bioactive peptides from protein-rich waste. *International journal of molecular sciences*, 17(6), 950
- Lima, R. de C. L., Berg, R. S., Rønning, S. B., Afseth, N. K., Knutsen, S. H., Staerk, D., & Wubshet, S. G. (2019). Peptides from chicken processing by-product inhibit DPP-IV and promote cellular glucose uptake: potential ingredients for T2D management. *Food & Function*. doi:10.1039/c8fo02450b
- Liu, S. (2017). Enzymes. *Bioprocess Engineering*, 297–373. doi:10.1016/b978-0-444-63783-3.00007-1
- Londoño-Zapata, L., Franco-Cardona, S., Restrepo-Manotas, S. et al. (2022). Valorization of the By-products of Poultry Industry (Bones) by Enzymatic Hydrolysis and Glycation to Obtain Antioxidants Compounds. *Waste Biomass Valor* <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01801-1>
- López-Gallego, F., Fernandez-Lorente, G., Rocha-Martín, J., Bolívar, J.M., Mateo, C., Guisan, J.M. (2020). Multi-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Glyoxyl Agarose with Minimal Physico-Chemical Modification: *Stabilization of Industrial Enzymes*. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_5
- Maestri, E., Pavlicevic, M., Montorsi, M., & Marmiroli, N. (2018). Meta-Analysis for Correlating Structure of Bioactive Peptides in Foods of Animal Origin with Regard to Effect and Stability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 3–30. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12402>
- Mateo, C., Abian, O., Bernedo, M., Cuenca, E., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., ... Guisán, J. M. (2005). Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme and Microbial Technology*, 37(4), 456–462. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.03.0
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463. doi:10.1016/j.enzmictec.2007.01.0
- Memon, A., Ding, R., Yuan, Q., Wei, Y., & Liang, H. (2019). Facile synthesis of alcalase-inorganic hybrid nanoflowers used for soy protein isolate hydrolysis to improve its functional properties. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2019.03.09
- Moutinho, S., Martínez-Llorens, S., Tomás-Vidal, A., Jover-Cerdá, M., Oliva-Teles, A., & Peres, H. (2017). Meat and bone meal as partial replacement for fish meal in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles: Growth, feed efficiency, amino acid utilization, and economic efficiency. *Aquaculture*, 468, 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.10.024>
- Mustafa, Ahmad. (2015). Immobilization method review
- Neidhart, D.J. & Petsko, G.A. (1988). The refined crystal structure of subtilisin Carlsberg at 2.5 Å resolution. *The Protein Data Bank Protein Eng* 2: 271-276. doi: 10.1093/protein/2.4.271
- Nikolaev, I. V., Sforza, S., Lambertini, F., Ismailova, D. Y., Khotchenkov, V. P., Volik, V. G., ... Koroleva, O. V. (2016). Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: Optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization. *Food Chemistry*, 197, 611–621. doi:10.1016/j.foodchem.2015.10.11410.1016/j.foodchem.2015.10.114
- Novozymes. (2016). Proteases for biocatalysis. *Novoenzymes*, 1–6
- Okuda, K., Urabe, I., Yamada, Y., & Okada, H. (1991). Reaction of glutaraldehyde with amino and thiol compounds. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 71(2), 100–105. doi:10.1016/0922-338x(91)90231-5
- O'Meara, G. M., & Munro, P. A. (1984). Effects of reaction variables on the hydrolysis of lean beef tissue by alcalase. *Meat Science*, 11(3), 227–238. doi:10.1016/0309-1740(84)90039-1
- Onuh, J. O., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Aluko, R. E., & Aliani, M. (2015). Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering

- effects in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Functional Foods*, 14, 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.031>
- Paiva-dos Santos, K., Silva, C., Santa Brígida, A., & Goncalves, L. (2020). Modifying alcalase activity and stability by immobilization onto chitosan aiming at the production of bioactive peptides by hydrolysis of tilapia skin gelatin. *Process Biochemistry*, 97, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.019>
- Pessato, T. B., Carvalho, N. C. de, Tavano, O. L., Fernandes, L. G. R., Zollner, R. de L., & Netto, F. M. (2016). Whey protein isolate hydrolysates obtained with free and immobilized Alcalase: Characterization and detection of residual allergens. *Food Research International*, 83, 112–120. doi:10.1016/j.foodres.2016.02.015
- Qu, W., Sehemu, R. M., Zhang, T., Song, B., Yang, L., Ren, X., & Ma, H. (2018). Immobilized enzymolysis of corn gluten meal under triple-frequency ultrasound. *International Journal of Food Engineering*, 14(5-6). doi:10.1515/ijfe-2017-0347
- Quaglia, G. B., & Orban, E. (1987). Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*sardina pilchardus*) by commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 38(3), 263–269. doi:10.1002/jsfa.2740380310
- Reimerdes, E. H., & Klostermeyer, H. (1976). [3] Determination of proteolytic activities on casein substrates. In *Methods in enzymology* (Vol. 45, pp. 26-28).
- Rifqi, Jamhari, & Erwanto, Y. (2020). Isolation and characterization of collagen from local goat bone using pepsin hydrolysis. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 492, 012083. doi:10.1088/1755-1315/492/1/012083
- Robotjazi, Seyed Morteza, Saleknezhad, Maryam, & Raesi, Mohammad Taghi. (2020). Hydrolysis of the protein content of poultry slaughterhouse waste using alcalase enzyme in the fixed-bed system. *Journal of Environment and Biotechnology Research*, 9(2-4), 13–20. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4146868>
- Romero-Garay, M. G., Montalvo-González, E., Hernández-González, C., Soto-Domínguez, A., Becerra-Verdín, E. M., & García-Magaña, M. D. L. (2022). Bioactivity of peptides obtained from poultry by-products: A review. *Food Chemistry: X*, 13, 100181.
- Roslan, J., Yunos, K. F. M., Abdullah, N., & Kamal, S. M. M. (2014). Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 312–319. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.044>
- Rutherford, S. M. (2010). Methodology for Determining Degree of Hydrolysis of Proteins in Hydrolysates: A Review. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 93(5), 1515–1522. doi:10.1093/jaoac/93.5.1515
- Salwane, S. & Wan mustapha, Wan & Mamot, S. & Maskat, Mohamad & Ibrahim, Saadiah. (2013). Effects of Enzyme Concentration, Temperature, pH and Time on the Degree of Hydrolysis of Protein Extract from Viscera of Tuna (*Euthynnus affinis*) by Using Alcalase. *Sains Malaysiana*. 42. 279-287.
- Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29–46. <https://doi.org/10.1093/fqs/fyx006>
- Shen, C.-H. (2019). Gene Expression: Translation of the Genetic Code. *Diagnostic Molecular Biology*, 87–116. doi:10.1016/b978-0-12-802823-0.00004-3
- Sirisha, V. L., Jain, A., & Jain, A. (2016). Enzyme Immobilization. *Advances in Food and Nutrition Research*, 179–211. doi:10.1016/bs.afnr.2016.07.004
- Siswoyo, Tri Agus & Matra, Nur & Safiera, Anadini & Supriyadi, Anang. (2017). Synthesis of Antioxidant Peptides from Melinjo (Gnetum gnemon) Seed Protein Isolated Using Sol-Gel Immobilized Alcalase. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology*. 7. 1315. 10.18517/ijaseit.7.4.936
- Souissi, Nabil & Bougatef, Ali & Triki-Ellouz, Youssa. (2007). Biochemical and Functional Properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) By-Product Hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*. 45.
- Sun, X., Acquah, C., Aluko, R. E., & Udenigwe, C. C. (2020). Considering food matrix and gastrointestinal effects in enhancing bioactive peptide absorption and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 64, 103680
- Tacias-Pascacio, V. G., Morellon-Sterling, R., Siar, E. H., Tavano, O., Berenguer-Murcia, Á., & Fernandez-Lafuente, R. (2020a). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2143–2196. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.060>
- Tarimo, D. J., Oyedotun, K. O., Sylla, N. F., Mirghni, A. A., Ndiaye, N. M., & Manyala, N. (2022). Waste chicken bone-derived porous carbon materials as high-performance electrode for supercapacitor applications. *Journal of Energy Storage*, 51, 104378. <https://doi.org/10.1016/j.est.2022.104378>
- Teshnizi, Z. M., Robotjazi, S. M., & Mosaabadi, J. M. (2020). Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Poultry Slaughterhouse Wastes using Alcalase Enzyme for the Preparation of Protein Hydrolysates. *Applied Food Biotechnology*, 7(3), 153–160. <https://doi.org/10.22037/AFB.V7I3.28417>
- Tran, D. N., & Balkus, K. J. (2011). Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. *ACS Catalysis*, 1(8), 956–968. doi:10.1021/cs200124a
- 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. doi:10.1016/j.procbio.2013.11.012
- Vázquez, J. A., Rodríguez-Amado, I., Sotelo, C. G., Sanz, N., Pérez-Martín, R. I., & Valcárcel, J. (2020). Production, Characterization, and Bioactivity of Fish Protein Hydrolysates from Aquaculture Turbot (*Scophthalmus maximus*) Wastes. *Biomolecules*, 10(2), 310. <https://doi.org/10.3390/biom10020310>
- Velasco-Lozano, S., López-Gallego, F., Mateos-Díaz, J. C., & Favela-Torres, E. (2016). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement a review. *Biocatalysis*, 1(1), 166–177. <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0012>
- Vijayaraghavan, P., Rathi, M., Almaary, K. S., Alkhattaf, F. S., Elbadawi, Y. B., Chang, S. W., & Ravindran, B. (2022). Preparation and antibacterial application of hydroxyapatite doped silver nanoparticles derived from chicken bone. *Journal of King Saud University - Science*, 34(2), 101749. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101749>
- Viji, P., Phannendra, T. S., Jesmi, D., Madhusudana Rao, B., Dhiju Das, P. H., & George, N. (2019). Functional and antioxidant properties of gelatin hydrolysates prepared from skin and scale of sole fish. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(10), 976-986
- Wang, B., Meng, T., Ma, H., Zhang, Y., Li, Y., Jin, J., & Ye, X. (2016). Mechanism study of dual-frequency ultrasound assisted enzymolysis on rapeseed protein by immobilized Alcalase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 32, 307–313. doi:10.1016/j.ultsonch.2016.03.02
- Wang, S., Zhang, C., Qi, B., Sui, X., Jiang, L., Li, Y., ... Zhang, Q. (2014). Immobilized alcalase alkaline protease on the magnetic chitosan nanoparticles used for soy protein isolate hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 239(6), 1051–1059. doi:10.1007/s00217-014-2301-1
- Wubshet, S. G., Wold, J. P., Afseth, N. K., Böcker, U., Lindberg, D., Ihunegbo, F. N., & Måge, I. (2018). Feed-Forward Prediction of Product Qualities in Enzymatic Protein Hydrolysis of Poultry By-products: a Spectroscopic Approach. *Food and Bioprocess Technology*, 11(11), 2032–2043. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2161-y>

- Xuan Thanh Tram, N., Ishikawa, K., Minh, T. H., Benson, D., & Tsuru, K. (2021). Characterization of carbonate apatite derived from chicken bone and its in-vitro evaluation using MC3T3-E1 cells. *Materials Research Express*, 8(2), 025401. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/abe018>
- Yang, A., Long, C., Xia, J., Tong, P., Cheng, Y., Wang, Y., & Chen, H. (2017). Enzymatic characterisation of the immobilised Alcalase to hydrolyse egg white protein for potential allergenicity reduction. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(1), 199–206. doi:10.1002/jsfa.7712
- Yao, Y., Wang, M., Liu, Y., Han, L., & Liu, X. (2020). Insights into the improvement of the enzymatic hydrolysis of bovine bone protein using lipase pretreatment. *Food Chemistry*, 302, 125199. doi:10.1016/j.foodchem.2019.12519
- Ye, Q., Chen, K., Yang, X., Xiao, K., & Shen, Y. (2021). Facile and moderate immobilization of proteases on SPS nanospheres for the active collagen peptides. *Food Chemistry*, 335, 127610. doi:10.1016/j.foodchem.2020.12761
- Yusop, S. M., Nadalian, M., Babji, A. S., Mustapha, W. A. W., Forghani, B., & Azman, M. A. (2016). Production of antihypertensive elastin peptides from waste poultry skin. *Int J Food Eng*, 2, 21-25. doi: 10.18178/ijfe.2.1.21-25
- Zhang G., Yue X., Fan A., Liu G. Reutilization of waste chicken bone as nutrients source; *4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*; 18-20 June 2010; Chengdu, China. (2010). pp. 18–20
- Zheng, Y., Li, Y., Zhang, Y., & Zhao, S. (2016). Purification, characterization, and synthesis of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of coconut (*Cocos nucifera* L.) cake protein isolates. *RSC Advances*, 6(59), 54346–54356. doi:10.1039/c6ra07086h
- Zhou, Y., Wu, C., and Chang, J. (2019). Bioceramics to regulate stem cells and their microenvironment for tissue regeneration. *Mater. Today* 24, 41–56. doi: 10.1016/j.mattod.2018.07.016
- Zhou, Z., Li, G., & Li, Y. (2010). Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate–chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 47(1), 21–26. doi:10.1016/j.ijbiomac.2010.04.00
- Zhu, Hao & Zhang, Yi & Yang, Tao & Zheng, Dongyun & Liu, Xiaojun & Zhang, Juntao & Zheng, Mingming. (2022). Preparation of immobilized Alcalase based on metal affinity for efficient production of bioactive peptides. *LWT*. 162. 113505. 10.1016/j.lwt.2022.113505
- Žuža, M. G., Milašinović, N. Z., Jonović, M. M., Jovanović, J. R., Kalagasidis Krušić, M. T., Bugarski, B. M., & Knežević-Jugović, Z. D. (2017). Design and characterization of alcalase-chitosan conjugates as potential biocatalysts. *Bioprocess and biosystems engineering*, 40(11), 1713–1723.