

Metodologías de inmovilización de Alcalasas para la obtención de polipéptidos bioactivos a partir de huesos de pollo: una revisión de literatura

Alcalase immobilization methodologies for obtaining bioactive polypeptides from chicken bones: a literature review.

*Valeria Pino**, *Angie Benavides***

RESUMEN

En Colombia, al año se producen alrededor de 240000 toneladas de residuos provenientes de los huesos de pollo. Este subproducto presenta una gran cantidad de péptidos potencialmente bioactivos que pueden ser aprovechados por diversas industrias. A lo largo de los años, se ha usado la enzima Alcalasa para hidrolizar residuos de la industria alimenticia, a pesar de esto, el uso en su forma libre puede causar dificultades operacionales y altos costos de proceso. Con el fin de solucionar esta problemática que presenta la hidrólisis con enzimas libres, se han adelantado investigaciones sobre procesos de inmovilización enzimática. Este proceso es capaz de proveer de algunas ventajas al biocatalizador. Hasta la fecha no se encuentran antecedentes de hidrólisis de huesos de pollo con enzimas inmovilizadas por lo que esta revisión tuvo como objetivo presentar que técnica de inmovilización es potencialmente la mejor opción para ser aplicada en la hidrólisis de estos subproductos. Esto fue posible mediante análisis bibliométrico para reconocer el impacto del tema en la comunidad científica. Se encontraron diferentes metodologías aplicadas en sustratos vegetales y animales, se contrastaron las diferencias fisicoquímicas de las matrices, esto con la finalidad de analizar aquellas que fueron aplicadas en sustratos fisicoquímicamente similares a los huesos de pollo. Finalmente se realizó un cuadro comparativo presentando ventajas y desventajas de 7 metodologías de inmovilización diferentes, encontrando así que a nivel operacional la unión covalente multipunto con esferas de quitosano con glutaraldehído resulta ser la metodología más ventajosa, económica y eficaz para ser aplicada en los huesos de pollo.

Palabras Clave: Huesos de pollo, hidrólisis enzimática, Alcalasa, Inmovilización enzimática, Péptidos bioactivos.

ABSTRACT

In Colombia, around 240000 tons of waste from chicken bones are produced per year. This by-product has a large amount of potentially bioactive peptides that can be exploited by various industries. Over the years, the enzyme Alcalase has been used to hydrolyze waste from the food industry, however, the use in its free form can cause operational difficulties and high process costs. To solve this problem of hydrolysis with free enzymes, research has been carried out on enzyme immobilization processes. This process can provide some advantages to the biocatalyst. To date, there are no antecedents of hydrolysis of chicken bones with immobilized enzymes, so this review aimed to present which immobilization technique is potentially the best option to be applied in the hydrolysis of these by-products. This was possible through bibliometric analysis to recognize the impact of the topic in the scientific community. Different methodologies applied on plant and animal substrates were found, and the physicochemical differences of the matrices were contrasted to

analyze those that were applied on substrates that were physicochemically like chicken bones. Finally, a comparative table was made presenting advantages and disadvantages of 7 different immobilization methodologies, thus finding that at the operational level the multipoint covalent bonding with chitosan spheres with glutaraldehyde turns out to be the most advantageous, economic, and effective methodology to be applied on chicken bones.

* Estudiante de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi. Santiago de Cali. valeria.pino@u.icesi.edu.co

** Asistente de investigación y docencia del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad Icesi. Santiago de Cali. anbenavides@icesi.edu.co

Keywords: Chicken bones, enzymatic hydrolysis, Alcalase, Enzyme immobilization, Bioactive peptides.

INTRODUCCIÓN

En Colombia la industria avícola es uno de los motores para el impulso de la economía, según cifras oficiales de FENAVI para el año 2020 se presentó una producción superior a 1.600.000 toneladas de pollo lo que equivale aproximadamente a 17.5 billones de pesos en ingresos. Sin embargo, aproximadamente el 15% del peso de un pollo mediano corresponde a huesos, que son desechados en rellenos sanitarios, causando contaminación (Federación Nacional de & Avicultores de Colombia, 2018) (Arévalo Bohórquez, 2014). Estos subproductos contienen proteínas y otros nutrientes de los cuales es posible obtener péptidos con propiedades potencialmente bioactivas que pueden ser aprovechados para formulaciones alimentarias beneficiosas para la salud mediante métodos de hidrólisis enzimática. (Aspevik *Et al.*, n.d.) (Tapal & Tiku, 2018)

La hidrólisis enzimática consiste en la ruptura de moléculas de proteína en péptidos de tamaños diversos, mediante el uso de enzimas hidrolasas. En este proceso la Alcalasa ha demostrado estar entre las proteasas más eficientes (Tacias-Pascacio *et al.*, 2020), mostrando mejoras en las propiedades nutraceuticas y funcionales de los hidrolizados con actividades antioxidantes, antihipertensivas, antimicrobianas, anticoagulantes y antitumorales. No obstante, realizar el proceso con enzimas libres, resulta ser poco viable, una de las causas se debe a la baja cantidad de producto que se obtiene en relación con la concentración de biocatalizador requerida (Moo-Young, 2011). Otras de las problemáticas de la hidrólisis con proteasas es que pueden sufrir de autólisis, su alta solubilidad en agua les impide recuperarse del medio imposibilitando su reutilización y, además estas enzimas pueden ser inhibidas por producto al formarse un complejo enzima-producto estable a medida que se obtienen los péptidos (Kasper *et al.*, 2014) (Valencia *et al.*, 2014).

Por lo anterior y al existir un incremento en la necesidad de obtener proteínas de diferentes fuentes para suplir las necesidades de una población creciente y ante las dificultades que presenta la hidrólisis con enzimas libres, los investigadores han adelantado estudios con Alcalasas inmovilizadas para hidrolizar distintos sustratos y obtener péptidos potencialmente bioactivos para realizar procesos de hidrólisis más eficientes. La ventaja ante las enzimas libres es que al realizar este confinamiento aportan a las mismas robustez y resistencia frente a temperatura y presión (Glomm *et al.*, 2021). Además, es posible que la enzima pueda reutilizarse en otros procesos y su unión con el soporte facilita el almacenamiento, reduce costos y también mejora las funciones catalíticas como actividad, estabilidad y selectividad (Cao, 2011).

Entre los sustratos más estudiados para la obtención de polipéptidos se encuentran la clara de huevo, el suero de leche, la caseína y diversas fuentes vegetales como la soja, el trigo y la canola. También, existen otros sustratos menos estudiados, como la piel de tilapia, la colza, tendones, sangre y huesos de res, pescado y pollo, para este último, una de las posibles razones de su limitado estudio es que al ser matrices heterogéneas son difíciles de manejar y requieren tratamiento previo (imbshet *et al.*, 2018). Esto puede incurrir en costos adicionales que incrementen el valor de la

producción de los hidrolizados, además el contenido proteico de los huesos se encuentra rodeado de calcio, lo que hace que sea de difícil acceso y se corre el riesgo de dañar la proteína (Meyers *et al.*, 2008). Actualmente, se reportan un estudio que usa subproductos de la industria avícola como tendones, para la obtención de péptidos con Subtilisina A. Los resultados obtenidos muestran la obtención de péptidos bioactivos antioxidantes, que pueden ser posteriormente usados por diferentes industrias.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados y considerando que la información encontrada sobre la inmovilización enzimática para la hidrólisis de huesos de pollo es limitada. Esta revisión de literatura busca presentar que técnica de inmovilización es potencialmente la mejor opción para ser aplicada en la hidrólisis de subproductos de la industria avícola para la obtención de polipéptidos bioactivos. Esto se llevará a cabo mediante una comparación fisicoquímica de los huesos de pollo con los sustratos usados en las diferentes investigaciones, analizando los resultados de las investigaciones y finalmente contrastando ventajas y desventajas de las metodologías donde usen sustratos fisicoquímicamente similares a los huesos de pollo.

Métodos

Revisión sistemática de literatura

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. Ahora bien, 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”)) disponibles en títulos, resúmenes y palabras. Finalmente, se obtuvo una lista con todos los documentos de interés, a fin de exportar cada uno en formato “CSV” y utilizarlos en el posterior análisis bibliométrico con la herramienta de manejo de datos Microsoft Excel.

Bibliometría

La búsqueda inicial en Scopus con la fórmula (("Alcalase" OR "Subtilisin") AND ("Immobilized" OR "Immobilization")) arrojó 386 resultados, para evaluar la producción científica. De esta manera, para evaluar el impacto científico se consideraron indicadores producción científica anual y revistas de publicación.

Figura 1 Producción científica anual.

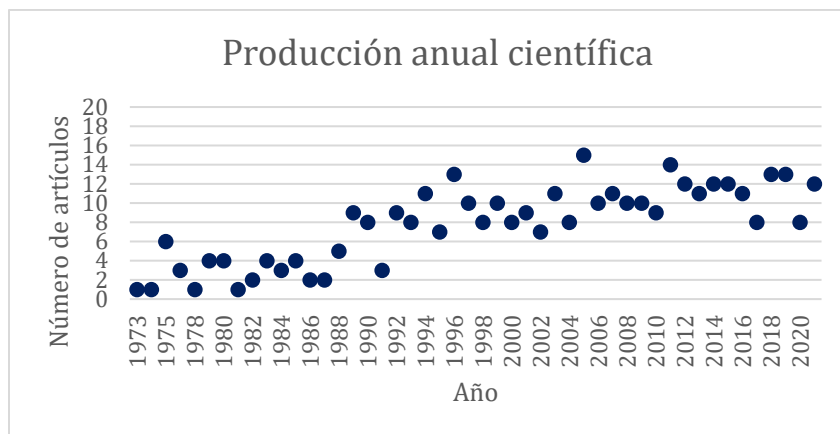
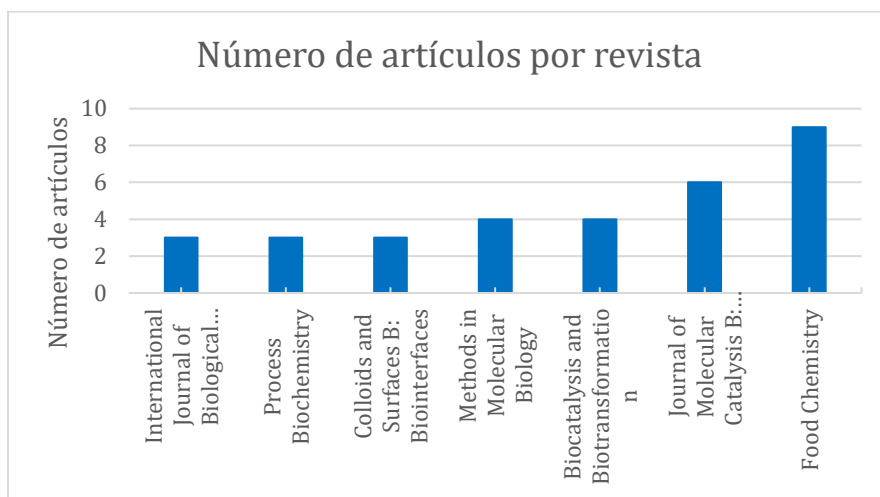


Figura 2 Dispersión de literatura científica.



En la figura 1 se evidencia que a partir del año 1973 inicia la producción científica, pero es a partir de los años 90 inicia un crecimiento en la productividad científica y esto puede sustentarse en la necesidad creciente de obtener proteínas de diferentes fuentes. A pesar de que la producción científica es muy constante, es necesario tener información actualizada por lo que el periodo de tiempo a estudiar será a partir del año 2011 a fin de conocer la tendencia de la última década, evaluando 126 artículos. Después del año 2010 la producción científica se mantiene entre 10 y 14 publicaciones todos años hasta el 2021 salvo por pequeñas oscilaciones en los años 2017 y 2020, donde el número de publicaciones desciende a 8, se espera que esta tendencia presente crecimiento en el futuro. Ahora bien, en lo que va del 2022 se han registrado 5 publicaciones, por lo que no es conveniente valorar con certeza su productividad, sin embargo, teniendo en cuenta las oscilaciones en el comportamiento de la comunidad científica a través del tiempo, es posible que este año culmine con 8-15 publicaciones. Por lo anterior, se evidencia que la producción de hidrolizados de proteínas mediados por hidrólisis enzimática con enzimas inmovilizadas es un tema de interés, lo que ha llevado a que en los últimos años incrementen las investigaciones alrededor del tema. Teniendo en cuenta que es necesario llevar a cabo el análisis de información actualizada y que las técnicas de inmovilización más relevantes son las implementadas en la última década, se tendrán en cuenta solo los artículos publicados entre el 2011 y el 2021.

Por su parte, en la figura 2 se encuentra una relación entre el número de revistas y el número de artículos científicos publicados sobre el tema de interés. Esta indica que la mayoría de la producción

científica se concentra en Food Chemistry, Journal of Molecular Catalysis, Biocatalysis and biotransformation y methods in molecular biology. Los artículos de investigación pertenecientes a estas revistas están 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. Sin embargo, se encontró que en revistas colombianas no se ha realizado ninguna publicación sobre el tema, por lo cual, con el fin de contribuir en la producción científica del país, esta revisión se realizó con el formato de publicación para la revista colombiana de biotecnología.

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, para llevar a cabo una segunda filtración se tuvieron en cuenta los 125 documentos publicados a partir del 2011 con el fin de, reconocer los problemas, estrategias, avances y recomendaciones que pudieron o no abordarse hasta la actualidad, utilizando artículos de revisión provenientes de otras bases de datos que apoyen el desarrollo de este proyecto.

Criterios de filtración

Una vez recolectadas las investigaciones, se procedió a filtrar la información revisando 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 1). 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 las características técnicas de las metodologías de inmovilización.

Tabla 1. Criterios de selección de los artículos.

Factor	Criterio
Catalizador	Alcalasa o Subtilisina; con o sin catálisis simultánea con otras enzimas
Sistema	Inmovilización; independiente del tipo
Sustrato	Proteína vegetal y/o animal
Variables a evaluar	Grado de hidrólisis, ciclos de uso, actividad residual
Producto	Hidrolizados de proteínas; con o sin caracterización

Aplicando estos criterios se evaluaron 20 artículos entre proteínas animales y vegetales con el fin de encontrar que metodología de inmovilización es la más adecuada para ser aplicada en la hidrólisis de huesos de pollo, realizando una comparación de los sustratos y discutiendo factores técnicos de las metodologías, que técnica de inmovilización se podría aplicar a la hidrólisis de huesos de pollo.

PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS CON ALCALASA INMOVILIZADA.

El desperdicio de alimentos comprende todo el proceso de producción, distribución, venta y elaboración, incluyendo materiales crudos o cocidos, y las pérdidas antes durante y después de la preparación doméstica. Lo componen materiales vegetales o animales, incluidos huesos y órganos. Hasta hace unos años, la sociedad no consideraba los residuos alimentarios como un coste ni un beneficio, siendo tratados únicamente para compostaje o desechados (Nazzaro *et al.*, 2018).

El incremento de la producción de pollo en Colombia acrecienta la preocupación de la cantidad de desechos, ya que en torno al 30% del peso total se clasifica como residuo (Aspevik *et al.*, n.d.) entre los cuales se encuentran cabezas, huesos, sangre, piel, vísceras, pezuñas y plumas, sin contar los desechos sólidos que generan las aves a lo largo de su vida. Todo esto, genera problemas ambientales como la acumulación de materia orgánica que atrae insectos y roedores. También el alto contenido de nitrógeno lleva a la formación de nitratos que propician el desarrollo de microorganismos con potencial patógeno para animales y humanos (Tamayo Rojas, 2014)

Lo anterior ha contribuido al incremento en la contaminación mundial por lo cual se ha buscado alternativas para tratar estos desechos. Una de las opciones para obtener valor agregado de estos subproductos es la hidrólisis enzimática con Alcalasas. Este proceso consiste en la ruptura de enlaces péptidos llevado a cabo por una enzima. La subtilisina A es una serina endopeptidasa proveniente de *Bacillus subtilis* con sitios activos conformados por la tríada catalítica 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) (Ye *et al.*, 2021). A nivel industrial son muy significativas debido a su actividad y estabilidad a valores de pH alcalino. Además, tienen un alto potencial para la liberación de polipéptidos a partir de diferentes fuentes proteicas que cuando son consumidos proporcionan una influencia positiva al tener efectos fisiológicos similares a los de las hormonas.

HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS VEGETALES

Previamente, se ha estudiado los hidrolizados de proteínas vegetales para la obtención de péptidos bioactivos usando métodos convencionales de hidrólisis ácida, alcalina y enzimática (de Queiroz *et al.*, 2017). La hidrólisis enzimática atrae mayor atención por su simplicidad, alta selectividad y naturaleza respetuosa con el medio ambiente (Xue *et al.*, 2018). Por lo anterior, los investigadores han buscado diferentes alternativas de inmovilización enzimática, como se evidencia en tabla 2, que permitan hacer más atractiva esta propuesta de hidrólisis.

Tabla 2 metodologías de inmovilización en sustratos vegetales

Sustrato	Técnica de inmovilización	Actividad enzimática (UI/g)	%DH	ciclos de uso	Actividad residual	Referencias
Soja	Nanopartículas magnéticas de quitosano	0,87	18.38	10	86%	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
	Unión covalente con perlas de alginato de sodio con carbodiimida por extrusión electrostática	10,64	26,5	8	-	(Jonovic <i>et al.</i> , 2021)
	Unión covalente con perlas de alginato de sodio con carbodiimida por pulverización ultrasónica	10,64	16.00	8	-	(Jonović <i>et al.</i> , 2021)
	Nanocompuesto con CaHPO4	-	35.00	7	83%	(Memon <i>et al.</i> , 2019)
Colza	Unión covalente con perlas de alginato de sodio	90,00	18,40	-	-	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Semilla de melinjo	Matriz sol-gel	-	23.00	-	-	(Siswoyo <i>et al.</i> , 2017)
Zeina (proteína de maíz)	Perlas de alginato de sodio con ultrasonido	-	20.60	-	-	(Qu <i>et al.</i> , 2018)
	Soporte compuesto de alginato-calcio-quitosano	-	59.1	3	36%	(Wang <i>et al.</i> , 2014)

Tabla 2 construida a través de los resultados encontrados en diferentes artículos de hidrólisis de proteínas vegetales con enzimas inmovilizadas. Muestra la técnica de inmovilización usada, actividad enzimática inicial, grado de hidrólisis, cantidad de ciclos de uso y actividad residual.

En la tabla 2 se evidencia que uno de los sustratos más estudiados para su conversión en péptidos por hidrólisis con Alcalasa inmovilizada, es la soja. Se encontró que, S. nan Wang *et al* (2014) realizó la inmovilización con nanopartículas magnéticas recubiertas de quitosano, las condiciones óptimas se dieron a 55°C y pH 10. Con lo anterior, el grado de hidrólisis fue 18,38%, superando el valor encontrado con enzimas libres, que fue de 17,50%. Del mismo modo, la enzima logró conservar el 86% de la actividad después de diez ciclos de uso. Por otra parte Memon *et al.*, (2019) sintetizaron un nanocompuesto híbrido Alcalasa/CaHPO mediante la inmovilización de Alcalasa con fosfato de hidrógeno cálcico. Con este nanocompuesto, obtuvieron una actividad enzimática superior al 80% en un rango de condiciones de 50°C-70°C a pH 4 y con un grado de hidrólisis de 35%. Obteniendo hidrolizados de proteína de soja que poseían un 70% de capacidad de eliminación de radicales libres.

También, en estudios realizados por Jonović en 2021, inmovilizaron proteínas de soja en perlas de alginato de calcio mediante la técnica de atomización por pulverización ultrasónica y extrusión electrostática, evaluando los soportes sin secado (UA) y con secado (UAD). En esta técnica, se encontró que, bajo las mismas condiciones, pH 8.5 y 55°C, las enzimas inmovilizadas en el soporte con perlas obtenidas mediante extrusión electrostática con UAD expresaron una mayor actividad enzimática y grado hidrólisis. Lo anterior puede deberse a que las partículas UAD eran mucho más pequeñas que las UA, por lo que tenían una mayor área de superficie específica para hidrolizar los enlaces peptídicos. (Jonović *et al.*, 2021) (Jonović *et al.*, 2019)

Basándose en los resultados de los anteriores estudios, se encontró que el grado de hidrólisis más alto para la soja es 35%. Este resultado se logró con la técnica de un nanocompuesto híbrido mediante la inmovilización de Alcalasa con fosfato de hidrógeno cálcico. Esta técnica ha sido poco estudiada y los resultados obtenidos son prometedores, mostrando ventajas como la reducción de la resistencia a la transferencia de masa, la carga efectiva de enzimas y una mayor área de superficie. Estas características los investigadores las atribuyen a la formación de una estructura similar a pétalos de flores, donde la Alcalasa forma enlaces covalentes sobre la superficie (Zhao *et al.*, 2022). Por otra parte, el soporte brindó la posibilidad de llevar a cabo la hidrólisis a condiciones ácidas. Lo anterior, hace destacar al procedimiento ya que las condiciones de pH óptimas de la Alcalasa oscilan entre 6.5 y 7.8 (Figuerola *et al.*, 2012).

La colza es uno de los principales cultivos oleaginosos del mundo (Zhan *et al.*, 2022). La harina derivada de estas semillas contiene alrededor de 35% de proteína. A pesar de esto, su uso no es deseable para consumo humano debido a su alto contenido de ingredientes antinutricionales, incluidos los glucosinolatos, el ácido fítico y los taninos. (Xie *et al.*, 2022) (Lomascolo *et al.*, 2012). Sin embargo, B. Wang *et al* (2016) demostraron que mediante un método de enzimólisis asistida por ultrasonido de doble frecuencia, se logra un cambio en la estructura secundaria un incremento en la cantidad de proteínas solubles en el medio. Con este pretratamiento e inmovilizando la Alcalasas en perlas de alginato de calcio lograron tener acceso a la proteína de la colza aislando los componentes antinutricionales de la misma, lograron un grado de hidrólisis de 18,40% y actividad catalítica de 5516 UI con condiciones de 50°C y pH de 8.

La zeína reserva alrededor de 45-50% de la proteína del maíz, convirtiéndose en la proteína de almacenamiento más abundante de la planta (He *et al.*, 2021) (Zhang *et al.*, 2022). Con el fin de obtener péptidos bioactivos Y. Wang *et al* (2014) usaron Alcalasa y tripsinas inmovilizadas eficazmente en un soporte de alginato de calcio con quitosano; el procedimiento se llevó a cabo a 55°C y pH 8,5. Las condiciones favorecieron la obtención de un grado de hidrólisis de 59,1% conservando el 36,0% de la actividad después de tres ciclos de uso. También Qu *et al* (2018) realizó la desnaturalización de la proteína por medio de diferentes frecuencias de ultrasonido, para llevar a

cabo la hidrólisis con Alcalasa, sin embargo, el resultado del grado de hidrólisis terminó por debajo del obtenido en la investigación de Y. Wang *et al* (2014) .

En tabla 2 se evidencia que para las dos metodologías de inmovilización enzimática para hidrolizar zeína observamos una gran diferencia en el grado de hidrólisis. Según tabla 2 para los sustratos vegetales, el mayor grado de hidrólisis se consiguió mediante la digestión enzimática de la proteína de maíz con Alcalasa y tripsinas inmovilizadas en un soporte de alginato de calcio con glutaraldehído. Teniendo en cuenta que, para esta proteína, las dos técnicas de inmovilización realizadas son similares y dan resultados muy distantes. Lo anterior, puede atribuirse a qué Y. Wang *et al* (2014) llevó a cabo el proceso de hidrólisis con inmovilización multienzimática, lo que puede generar reacciones enzimáticas en cascada con un tiempo de conversión más corto y mayor afinidad al sustrato, logrando así hidrolizar una mayor cantidad de enlaces peptídicos (Chen *et al.*, 2018).

El grado de hidrólisis se define como el porcentaje de enlaces peptídicos cortados en los hidrolizados en relación con la cantidad de enlaces péptidos totales (B. Wang *et al.*, 2016). El bajo resultado obtenido por algunos sustratos en esta variable puede deberse a que la disponibilidad de enlaces peptídicos para hidrolizar se encuentra en menor proporción.

HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS DE ORIGEN ANIMAL

Con el fin de obtener hidrolizados de matrices animales, también se han adelantado investigaciones, reportadas en tabla 3, buscando diferentes alternativas de inmovilización de la enzima Alcalasa, que permitan evidenciar mejores resultados en los productos obtenidos y optimizar los procesos de producción de derivados animales, aprovechando los subproductos del sector agropecuario.

Tabla 3 Metodologías de inmovilización en sustratos de origen animales.

Sustrato	Contenido proteico	Técnica de inmovilización	Actividad enzimática (UI/g)	%DH	ciclos de uso	Actividad residual	Referencias
Clara de huevo	60% por ovoalbúmina	Absorción microperlas de quitosano	8,33		-	-	(Zuza <i>et al.</i> , 2017)
		Entrecruzamiento con microperlas de quitosano	4,17		-	-	(Zuza <i>et al.</i> , 2017)
		Unión covalente con microperlas de quitosano	13,08	29,85	5	90%	(Zuza <i>et al.</i> , 2017)
		Unión covalente con perlas de alginato de sodio con carbodiimida por extrusión electrostática	10,64	36,4	-	-	(Jonovic <i>et al.</i> , 2021)
		Unión covalente con perlas de alginato de sodio con carbodiimida por pulverización ultrasónica	10,64	35,9	8	-	(Jonovic <i>et al.</i> , 2021)
		Perlas magnéticas con carbodiimida	5	20,00	10	55%	(Yang <i>et al.</i> , 2016)
Albúmina	-	Nanocompuesto con HMSS-NH ₂ -Fe ³⁺	0,055	65,7	10	70,70%	(Zeng <i>et al.</i> , 2020)
Suero	55% de lactoglobulina	Unión covalente con perlas de Glyoxyl-agarosa	120	22,20	3	85%	(Pessato <i>et al.</i> , 2016).
		Unión covalente con soporte activado de glutaraldehído agarosa	200	8,00	10	54%	(Rocha <i>et al.</i> , 2017)
Piel de tilapia	Alrededor del 30% es colágeno tipo1	Unión covalente con esferas de quitosano con glutaraldehído (GLU-Chi).	100	77,00	5	60%	(Kimberle <i>et al.</i> , 2020)
		Unión covalente con esferas de quitosano con glioxilo (GLY-Chi)	100	77,00	5	32,85%	(Kimberle <i>et al.</i> , 2020)
		Unión covalente con esferas de quitosano con divinil sulfona	100	77,00	5	44,00%	(Kimberle <i>et al.</i> , 2020)

		Nanoesferas de poliestireno sulfonado	-	-	5	77,30%	(Ye <i>et al.</i> , 2021)
Tendones de pollo	75% de colágeno tipo 1	En partículas magnéticas de sílice con aminopropiltrimetoxisilano	-	-	6	85,00%	(Glomm <i>et al.</i> , 2021)
		En partículas magnéticas de sílice con Jeffamine	-	-	6	78,00%	(Glomm <i>et al.</i> , 2021)
		En partículas magnéticas de sílice con recubrimiento de quitosano	-	-	6	67,00%	(Glomm <i>et al.</i> , 2021)

Tabla 3 construida a través de los resultados encontrados en diferentes artículos de hidrólisis de proteínas animales con Alcalasas inmovilizadas. Muestra la técnica de inmovilización usada, actividad enzimática inicial, grado de hidrólisis, cantidad de ciclos de uso y actividad residual.

Ye *et al* (2021) Encontró que al hidrolizar piel de tilapia con Alcalasa inmovilizada en un soporte de nanoesferas de poliestireno sulfonado a pH 6,5 y 55°C, la actividad enzimática alcanzó el 77,3 % de su actividad inicial después de cinco ciclos de utilización. Con estas condiciones obtuvieron péptidos que alcanzaron el 89 % de eliminación de radicales DPPH y OH. Al analizar los hidrolizados concluyeron que el colágeno tipo I es el más abundante en los tejidos de este subproducto. Mientras que, para el mismo sustrato, Kimberle *et al* (2020) investigaron la activación de perlas de quitosano, obtenidas mediante extrusión electrostática, con diferentes agentes, como glutaraldehído (GLU-Chi), glioxilo (GLY-Chi) y divinil sulfona (DVS-Chi). Los investigadores notaron que los soportes hidrolizaron el 77 % de su proteína total inicial en péptidos menores de 100 kDa, después de 3 horas de reacción para todos los soportes. También los autores evaluaron la actividad residual de los diferentes soportes después de 5 ciclos de uso, notaron que el mejor rendimiento se obtenía con GLU-Chi, que mantuvo el 60% de su actividad inicial, además los hidrolizados obtenidos con este método presentaban mayor actividad antioxidante en la prueba DPPH.

El suero de leche también se ha usado en la obtención de hidrolizados bioactivos. Rocha *et al* (2017) evaluó la actividad antioxidante de hidrolizados de suero de leche, logrando eliminar más de 50% de los radicales libres presentes. Esto se logró usando una proteasa aspártica inmovilizada en un soporte activado de glutaraldehído agarosa. Con esta enzima evidenciaron que retuvo el 54% de la actividad inicial después de diez ciclos del proceso a 50°C, alcanzando un grado de hidrólisis de 6% a 8%. Por otra parte, la investigación realizada por Pessato *et al* (2016) muestra que la enzima Alcalasa inmovilizada en un soporte de glioxil-agarosa retuvo 85% de la actividad inicial con tres ciclos de uso a pH 8,7 y 48 °C. Estas condiciones permitieron obtener un grado de hidrólisis de 22,2%. También, encontraron que los hidrolizados obtenidos podían ser usados en la producción de hipoalérgicos. Esto mediante la detección y eliminación de los alérgenos residuales α -Lactoglobulina y β -Lactoglobulina.

Uno de los residuos de la industria avícola que se ha estudiado en los últimos años es la clara de huevo, Žuža *et al.* (2017) obtuvo perlas de quitosano por extrusión electrostática. Una vez obtenidas las perlas llevaron a cabo diferentes metodologías de inmovilización para Alcalasa, absorción, entrecruzamiento y unión covalente. Los investigadores encontraron que los mejores resultados de actividad enzimática los evidenciaba la unión covalente, que fue el soporte que se usó para llevar a cabo la hidrólisis. Esta metodología de inmovilización se ha convertido en un candidato prometedor para su uso en procesos industriales de hidrólisis de proteína de clara de huevo. Lo anterior se concluyó debido a su grado de hidrólisis de 29,85% con una carga enzimática de 23,6 UI/mg y de proteína de 340,2 mg/g, encontrando que después de cinco ciclos pierde alrededor del 10 % de su actividad inicial. Los resultados prometedores de la unión covalente, puede deberse a que es la técnica de inmovilización que mayores ventajas presenta, como la facilidad de ejecución y el enlace fuerte en la enzima y el soporte. Las enzimas inmovilizadas por adsorción y entrecruzamiento presentaron menor actividad enzimática, esto pudo ser causado por el impedimento estérico que

tiene la enzima y el sustrato. Por su parte, A. Yang *et al* (2017) inmovilizando Alcalasa en perlas magnéticas de carbodiimida a pH 8,0 y 60°C, mantuvo el 55% de su actividad inicial, después de 10 ciclos de uso, además lograron reducir eficazmente la unión de inmonoglobulina G y E, que es uno de los alérgenos alimentarios más comunes.

Por otra parte, para la hidrólisis de la principal proteína del huevo, la albumina, Zeng *et al* (2020) inmovilizó Alcalasa en perlas de sílice mesoporosas modificadas con HMSS-NH₂-Fe³⁺. En esta, encontraron que se redujo eficientemente las pérdidas de bioactividades causadas por la fuga de enzimas y la autólisis durante la catálisis. Con la técnica de inmovilización lograron conservar el 70,7% de la actividad inicial tras 10 ciclos de reutilización. Los investigadores encontraron que esta metodología resulta ser ventajosa ya que la interacción de coordinación entre el ion metálico y la Alcalasa cambió la conformación de la estructura secundaria de la enzima, lo cual le permite tener mayor resistencia y adhesión al soporte de sílice. Encontraron que la ventaja que proporciona usar soportes mesoporos huecos es el incremento del área de contacto, lo que beneficia la transferencia de masa al momento de la hidrólisis, razón por la cual logra un alto grado de hidrólisis conservando gran parte de su actividad catalítica inicial.

La hidrólisis de proteínas animales se ha convertido en una tecnología en desarrollo para la detección y eliminación de los alérgenos, esto es importante ya que la incidencia de alergias inducidas por alimentos y síntomas relacionados sigue aumentando en todo el mundo. Asimismo, con la hidrólisis enzimática se busca dejar de lado la glicación, una de las maneras para la eliminación de alérgenos, debido a la complejidad de la técnica. De los alimentos que más generan rechazo en los niños son, la leche y el huevo. Como se evidenció A. Yang y Pessato lograron la eliminación de estos alérgenos mediante la unión al complejo enzima-soporte, para la producción hidrolizados. Esto es importante teniendo en cuenta que la gravedad de la reacción es impredecible ya que puede presentarse anafilaxias hasta en 7% de los niños que padecen alergias. (Sánchez *et al.*, 2014) (De Greef *et al.*, 2012) (Sampson & York, 2001). Así mismo, la eliminación de estas proteínas no es algo viable ya que puede causar malnutrición o trastornos alimentarios, lo que influye negativamente en el crecimiento.

También, los hidrolizados obtenidos exhibieron capacidad antioxidante, mediante la eliminación de radicales libres que afectan la salud humana. Estos hidrolizados pueden ser usados como aditivos alimentarios y farmacéuticos (Sampath Kumar *et al.*, 2011). Para la eliminación de radicales libres la Alcalasa inmovilizada en un soporte de nanoesferas de poliestireno sulfonado de Ye *et al* (2021), logró un 89% de eficiencia, seguido del estudio de Kimberle *et al* (2020) con una eliminación del 77% de radicales libres. Lo anterior, puede ser consecuencia de la cantidad de colágeno tipo I que tiene la piel de tilapia Ye *et al* (2021), ya que este se caracteriza por sus capacidades antioxidantes. Esta facultad se ha demostrado con anterioridad, encontrando que potencia su acción con la hidrólisis enzimática (W. Li *et al.*, 2021) (Z. Li *et al.*, 2013) (Mateen *et al.*, 2019).

INMOVILIZACIÓN DE ALCALASA PARA HIDROLIZAR HUESOS DE POLLO.

Con el fin de seleccionar la metodología de inmovilización que más se adapte a la obtención de péptidos bioactivos hidrolizando huesos de pollo, fue necesario buscar que proteínas se asemejan más a las que están presentes en los huesos de pollo. Por lo que inicialmente se definió la conformación proteica de este subproducto.

Particularmente los huesos tienen un contenido de proteína fibrilar que oscila entre 8% y 35% (X. Wang *et al.*, 2018), el 70% corresponde a colágeno tipo I (Gisbert *et al.*, 2021), seguida de la osteocalcina, con 3%. Esta macromolécula es producida por los osteoblastos y se encarga de la fijación del calcio al hueso (Villarreal Brito *et al.*, 2013). El porcentaje restante los conforman proteoglicanos, proteínas implicadas en la adhesión celular y factores de crecimiento. (Fagbemi & Sithole, 2021) (Ghosh *et al.*, 2019). En cuanto a las proteínas globulares, los huesos de las aves de corral la poseen únicamente en el femur y el tibiotarso. La ausencia de este órgano en la mayoría de

los huesos hace posible que sean neummatizados con el fin de disminuir el peso corporal para favorecer el vuelo (Gil Cano, n.d.).

Con la búsqueda previa de información, se encontró que es posible liberar péptidos con las mismas bioactividades de matrices, tanto animales como vegetales (Adeva-Andany *et al.*, 2022). Sin embargo, no se producen con las mismas secuencias, ya que las proteínas animales contienen todos los aminoácidos esenciales, las vegetales por su parte carecen de histidina, fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano y valina (Lin *et al.*, 2017) (Sousa de Oliveira *et al.*, 2020), a excepción de la soja que cuenta con los aminoácidos esenciales convirtiéndose en la proteína vegetal más completa (Abdulkhani *et al.*, 2017). Por lo cual, a nivel molecular, las proteínas animales y vegetales no son comparables para la obtención de péptidos, a pesar de poder exhibir las mismas capacidades. (Montesano *et al.*, 2020).

De la misma manera, las proteínas de las dos matrices son diferentes. Particularmente, las proteínas vegetales se dividen en dos: glutaminas y prolaminas que son proteínas de almacenamiento, insoluble y soluble, respectivamente, se encuentran en los cereales su única función biológica es suministrar a la plántula nitrógeno y aminoácidos durante la germinación y se concentran en el endospermo. (Wieser, 2008) (Sharma & Rallabhandi, 2015). A pesar de que las proteínas vegetales difieran en conformación de las animales, su estudio nos permite conocer y complementar información acerca de las técnicas de inmovilización. También los sustratos de origen vegetal se consideran cada vez más relevantes para bioconversiones y ahora representan un importante punto de partida para la obtención de péptidos bioactivos, ya que al ser una materia prima más homogénea es maleable para obtener los resultados deseados, con esto el análisis de las proteínas vegetales puede aportar oportunidades de optimización y mejora, al momento de llevar las técnicas de inmovilización a matrices más complejas.

A pesar de que las proteínas animales compartan cadenas peptídicas formadas por los mismos aminoácidos, también difieren en conformación, lo que hace que al momento de ser hidrolizadas presenten resultados diferentes. Las proteínas animales se clasifican en fibrilares y globulares: las fibrilares como, miosina, actina, actinina, calpaínas, catepsinas, albúmina, creatina, queratina y colágeno (Fagbemi & Sithole, 2021) (Ghosh *et al.*, 2019) son estáticas y su función principal es la de proporcionar soporte mecánico a las células y los organismos, suelen ser insolubles y están formadas por una unidad repetitiva simple que se ensambla para formar fibras lineales (Katoh & Ando, 2017). Por su parte, las globulares como la ovoalbúmina y la lactoglobulina, son de fácil digestión y con una alta cantidad de aminoácidos esenciales, suelen ser muy solubles en soluciones acuosas, tienen múltiples funciones como unión, catálisis, regulación, transporte, inmunidad, señalización celular. La estructura terciaria de estas proteínas se caracteriza por ser mucho más compleja y con más plegamientos que en las fibrilares (Shen, 2019).

Como se detalló con anterioridad, los huesos de pollo se componen en su mayoría de proteínas fibrilares, por lo que, los sustratos fisicoquímicamente más similares, son: la piel de tilapia y los tendones de pollo. Los tendones de pollo tienen un contenido proteico superior al 80%, donde el 75% corresponde al colágeno tipo 1, el resto de las proteínas presentes en la matriz extracelular lo componen proteoglicanos como la decorina y el aggrecan (James *et al.*, 2008) (Moussa *et al.*, 2007). La piel de tilapia por su parte contiene alrededor de 30% en colágeno tipo 1 y una gran cantidad de lípidos y glicoproteínas. (Sun *et al.*, 2022) (Niu *et al.*, 2013).

En revisiones sistemáticas previas realizadas por Tacias-Pascacio *et al* (2020) reportaron que para proteínas presentes en piel de pescado los grados de hidrólisis con enzimas libres oscilaban entre el 70%-90%, encontrando el valor más alto, 93%, en la técnica realizada por (Amiza *et al.*, 2012). Sin embargo, para el proceso de hidrólisis realizado con enzimas inmovilizadas encontramos solo un precedente para esta variable que fue realizado por Kimberle *et al* (2020), donde Alcalasa inmovilizada en perlas de alginato obtenidas por extrusión electrostática, con diferentes activadores, obtuvieron grados de hidrólisis de 77%, durante 3 ciclos de uso. Por otra parte, en tabla 2 se evidencia que para las proteínas globulares el grado de hidrólisis es menor que en las fibrilares. Esto

puede deberse a la diferencia en la estructura tridimensional de las diferentes proteínas. (Mora & Jaimes, n.d.)

Como lo confirman Chalabi *et al* (2014) en su estudio realizado con proteasas en proteínas globulares y fibrilares, la estructura tridimensional, al igual que la secuencia de aminoácidos afectan las interacciones y los efectos de las enzimas en las proteínas. Por lo anterior, las proteínas fibrilares al tener una estructura menos compleja, facilita la interacción con la Alcalasa para llevar a cabo la hidrólisis. Por otra parte, las proteínas globulares al tener una estructura terciaria más compleja limitan los lugares de unión con el sitio activo de la enzima. Lo anterior puede deberse a que en la conformación proteica muchos sitios de unión se encuentran en la parte interna, donde la enzima no tiene acceso, limitando la reacción y dando como resultado, porcentajes de hidrólisis menores.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, y con el fin de elegir una metodología de inmovilización enzimática para hidrólisis de proteínas que presente resultados similares al momento de ser llevada a los huesos de pollo, se eligieron los sustratos más afines fisicoquímicamente, en este caso, la piel de tilapia y los tendones de pavo. Seis de las siete propuestas que se presentan para estos sustratos hacen parte de la técnica de unión covalente. Mediante el análisis realizado previamente se encontró que es la técnica más usada para la inmovilización de Alcalasas. Una de las causas es que con otras técnicas de inmovilización se requiere modificaciones complicadas que pueden conducir a la destrucción estructural de la proteasa. Particularmente las técnicas de encapsulación o atrapamiento pueden conducir a obstáculos estéricos con los sustratos. (Sommaruga *et al.*, 2014)

La inmovilización por unión covalente es una de las metodologías más empleadas, su principal motivo es debido a la formación de un enlace fuerte y resistente (Kurbanoglu *et al.*, 2018), debido a que la enzima se une a través de varios puntos de la estructura del soporte confiriéndole rigidez y resistencia térmica (Hassan *et al.*, 2019), esto incrementa la estabilidad del sistema a la temperatura, pH, fuerza iónica, solventes orgánicos y proteólisis. La principal desventaja de la inmovilización covalente de enzimas radica en que esta metodología es que puede ser más costosa comparada con otras, ya que el soporte utilizado necesita ser activado con reactivos químicos específicos previo al procedimiento de inmovilización. (J. Guisan, 2013).

En tabla 4, se realizó un compendio de ventajas y desventajas de cada una de las metodologías, con el fin de elegir la propuesta que presenta la menor complejidad de implementación.

Tabla 4 Ventajas y desventajas de las metodologías de inmovilización de piel de tilapia y tendones de pavo.

Metodología de inmovilización	Ventajas	Desventajas
Unión covalente multipunto con esferas de quitosano con glutaraldehído (GLU-Chi).	<ul style="list-style-type: none"> *El quitosano se caracteriza por no ser tóxico. *El quitosano se caracteriza por ser de bajo costo y altamente disponible * Geles con mayor durabilidad y estabilidad 	
Unión covalente multipunto con esferas de quitosano con glioxil (GLY-Chi)	<ul style="list-style-type: none"> * Presencia de grupos amino e hidroxilo libres en el quitosano puede servir eficazmente como sitios de adsorción activa *Estabilidad de los enlaces formados entre el soporte y la enzima * Definir la orientación de la enzima inmovilizada *Formación de bases de Schiff *Borohidruro de sodio transforma las bases de Schiff débiles en enlaces covalentes muy estables 	<ul style="list-style-type: none"> *Baja resistencia mecánica * Baja área superficial
Unión covalente con multipunto con esferas de quitosano con divinil sulfona		

Unión covalente en nanoesferas de poliestireno sulfonado	*Alta capacidad de almacenamiento conductividad de protones El poliestireno es el plástico de menor fundición	* Buena estabilidad mecánica * * El dodecil sulfato de sodio es corrosivo * Purga con nitrógeno * Precauciones por uso de ácido sulfúrico en la técnica de inmovilización * Uso de ultrasonificación para dispersión de ácido sulfúrico * El soporte pierde estabilidad mecánica con el tiempo
En partículas magnéticas de sílice con aminopropiltriethoxisilano		* Requiere cuidar el tamaño de las partículas, las propiedades del núcleo magnético, la morfología y la porosidad de las partículas, la estabilidad coloidal y la funcionalización. * Requiere polimerización previa a la inmovilización * Uso de ácido nítrico altamente corrosivo
En partículas magnéticas de sílice con Jeffamine	*Carga enzimática mayor a las partículas no porosas. Mayor actividad. * alta estabilidad, larga vida útil	
En partículas magnéticas de sílice con recubrimiento de quitosano		

Tabla 4 Lo propuesto en la tabla se logró a través de la recolección de información de diferentes autores.

En las metodologías de inmovilización con partículas magnéticas evaluadas en los tendones de pavo, se resalta que a pesar de que el soporte no es poroso, permite inmovilizar aproximadamente 100mg de proteína/gramo. El carácter magnético del soporte, hace que sea posible la separación del complejo enzima-soporte de un medio heterogéneo mediando un campo magnético externo (Dussán, 2008). Sin embargo, a pesar de que la magnetita es de uso común por sus fuertes propiedades magnéticas y su baja toxicidad, es necesario cuidar el núcleo magnético. Este núcleo ejerce fuerza electromagnética para reforzar la unión de la Alcalasa al soporte, sin embargo, las altas temperaturas, el contacto con un campo electromagnético externo al igual que su poca dispersión en agua y solventes orgánicos hacen que el campo pierda sus propiedades. Por esta razón es necesario un recubrimiento adicional ya sea orgánico o inorgánico para lograr prolongar la estabilidad del soporte extendiendo su vida útil (Rojas *et al.*, 2014).

En cuanto a los resultados para cada enlazador, los investigadores encontraron que, para el aminopropiltrimetoxisilano, se obtuvo una capa con una alta densidad de grupos amino con el potencial de unirse a grandes cantidades de enzima. En el caso de las partículas de sílice epoxi recubiertas con quitosano, dieron como resultado un recubrimiento similar a un gel hidrofílico con grupos amino, que puede ser adecuado para la actividad de proteasa de las enzimas inmovilizadas. El JEFFAMINE D-400 obtuvo una concentración superficial de grupos amino significativamente menor que el resto de los enlazadores. Esto podría atribuirse a al menos tres factores: un número reducido de sitios de unión en comparación debido al paso de epoxidación, cobertura de la submonocapa debido al impedimento estérico de las moléculas de Jeffamine unidas, o la reacción entre los grupos epoxi de la superficie y ambas aminas, lo que conduce a una concentración más baja de grupos amino sin reaccionar. (Glomm *et al.*, 2021)

En el caso de la adsorción en nanoesferas de poliestireno sulfonado, el método resulta sencillo y económico, uno de los motivos es que no implica una modificación química de la enzima a inmovilizar. Sin embargo, como las fuerzas que predominan son de carácter débil como, Van de Waals, interacciones iónicas y puentes de hidrogeno comúnmente ocurre desprendimiento de la enzima por las condiciones del proceso (J.A *et al.*, 2014). Una de las ventajas que brinda la técnica es que la inmovilización de la enzima ocurre en un menor tiempo que aquellas que forman enlaces covalentes. También, por las características del poliestireno exhibe una alta capacidad de almacenamiento a comparación de los compuestos biológicos y degradables. No obstante, el uso de una técnica de sonicación para la dispersión del ácido sulfúrico representa un riesgo para la integridad de la matriz y de la enzima a causa de la energía absorbida por la misma. (Puech *et al.*, 2014)

La unión covalente es la más eficiente y eficaz en cuanto a estabilidad para los procesos industriales alimentarios. Sin embargo, la actividad y la eficiencia de la enzima podrían verse disminuidas por una unión inadecuada que afecta el centro activo de la enzima (Abdollahi *et al.*, 2017). La unión

ocurre tras el ataque del nucleófilo de determinados aminoácidos expuestos al exterior de la superficie del enzima sobre los grupos reactivos químicos del soporte previamente funcionalizados. Para realizar el acople de sustrato/enzima se precisan de dos pasos: primero la activación de la matriz o soporte por adición de una función reactiva en un polímero, seguido de la modificación del polímero para producir un grupo activado. (Santiago *et al.*, n.d.)

En cuanto a la unión covalente multipunto, es una de las estrategias más estudiadas para lograr una alta estabilización enzimática debido a la rigidez de la estructura enzimática obtenida. Las esferas de quitosano caracterizan por exhibir diferentes bioactividades y tener capacidades de formación de geles y películas. A menudo se utiliza como soporte para la inmovilización de diferentes enzimas debido a la presencia en su superficie de dos grupos funcionales, amino ($-NH_2$) de hidroxilo ($-OH$), que pueden modificarse fácilmente para formar enlaces covalentes con las moléculas de la enzima. Su obtención es sencilla, económica además de ser biodegradable, a diferencia del poliestireno sulfonado.

El glutaraldehído puede interactuar con la enzima de diferentes maneras porque contiene restos iónicos e hidrofóbicos. Además, una primera aproximación enzima-soporte puede ocurrir por interacciones iónicas cuando los soportes (como el quitosano) tienen grupos amino primarios. Además, puede reaccionar con diferentes regiones de la enzima, pero generalmente con residuos que contienen grupos amino primarios, como lisina, arginina, asparagina, glutamina y el amino terminal. (Kimberle *et al.*, 2020)

Los soportes de glioxilo pueden establecer uniones covalentes intensas (base de Schiff) con grupos amino de lisina o amino terminal en la enzima, lo que hace que se utilice ampliamente para la estabilización de enzimas. Sin embargo, una desventaja de este soporte es el precio neto que incluye soporte, activadores y tiempo de funcionamiento del proceso de inmovilización en comparación con otros soportes. (Žuža *et al.*, 2017)

Para la divinil sulfona, en investigaciones previas ha encontrado que actúa de manera similar al glutaraldehído y puede modificar los grupos amino e hidroxilo presentes en la superficie del quitosano. El grupo funcional de vinilsulfona puede reaccionar con varios grupos: amino primario o secundario, hidroxilo, imidazol o tiol. Además, los soportes DVS muestran una mayor reactividad frente a la lisina, la tirosina y la histidina y residuos de cisteína, dependiendo de las condiciones de pH. Los enlaces covalentes que utilizan soportes DVS pueden ser incluso más intensos que con soportes de glioxilo (Kimberle *et al.*, 2020)

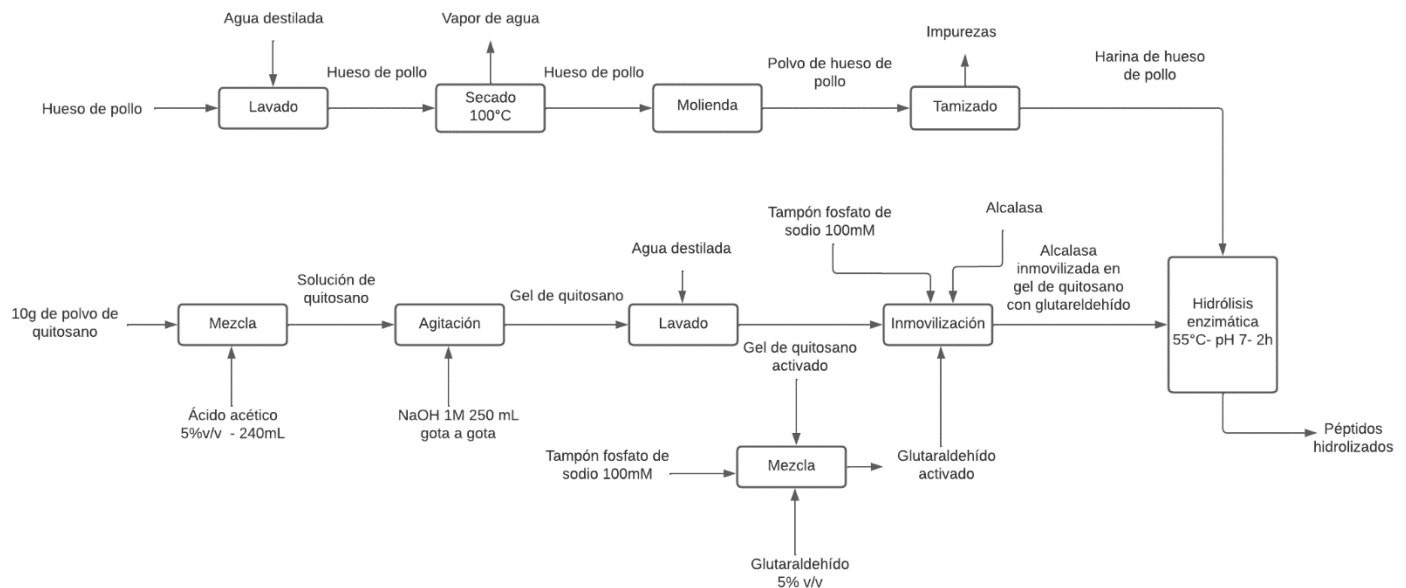
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por (Kimberle *et al.*, 2020) con los tres diferentes agentes reticulantes, encontraron que las esferas de quitosano con glutaraldehído presentaron un mejor desempeño al momento de inmovilizar la enzima, ya que lograron inmovilizar el 100% de enzima disponible en 15 horas, a diferencia de GLY-Chi y DVS-Chi, que después de 80 horas de iniciada la reacción, aún no inmovilizaban la totalidad de la enzima disponible. También el soporte que logró tener mayor estabilidad es GLU-Chi, esto puede explicarse porque éste presentó una mayor cantidad de residuos cercanos uno del otro, lo que facilita, la unión multipunto con la enzima. Los autores al momento de caracterizar los péptidos obtenidos mediante las diferentes técnicas encontraron que los hidrolizados que presentaron mayor actividad antioxidante en el método DPPH fueron los hidrolizados obtenidos por el método GLU-Chi, obteniendo $36,7 \mu\text{M}$ Trolox Eq a pH 10 y $35,5 \mu\text{M}$ Trolox Eq a pH 7, comparándolo con el soporte que presente superioridad operacional DVS-Chi, que obtuvo $22 \mu\text{M}$ Trolox Eq a pH 10. Sin embargo, los péptidos obtenidos por DVS-Chi no perdieron actividad antioxidante con el paso de los ciclos, a diferencia de los obtenidos por GLU-Chi.

Por lo anterior, la información encontrada apunta que la metodología que técnicamente presenta mayores ventajas en su sustrato de estudio es la unión covalente multipunto con esferas de quitosano con glutaraldehído, esto debido a que el grado de hidrólisis a pesar de ser menor que el obtenido en los procesos de hidrólisis realizados con Alcalasas inmovilizadas en partículas

magnéticas, la secuencia de pasos para inmovilizar en un soporte de quitosano con glutaraldehído, es fácilmente replicable y no representa altos costos, ya que a pesar de tener que activar el soporte, los reactivos usados son de fácil acceso por su bajo costo y se realizan en un solo paso. Por otra parte, además el glutaraldehído y el quitosano poseen residuos con los que la Alcalasa ejerce una mayor cantidad de enlaces, a pesar de que el silice también ha demostrado tener esta misma propiedad, el quitosano ha demostrado ser más efectivo en la adhesión de las enzimas, debido a la profundidad de los poros formados con sus geles. (Sommaruga *et al.*, 2014)

Además, la alta capacidad antioxidante exhibida por los péptidos obtenidos por esta técnica pueden ser usados en formulaciones farmacéuticas o nutracéuticas para reducir los radicales producidos durante el estrés oxidativo. Como se mencionó anteriormente la piel de tilapia y los huesos de pollo presentan similitudes en conformación. Lo que haría posible que la metodología de inmovilización pueda ser llevada a los huesos de pollo con posibles variaciones en los resultados obtenidos.

Gráfico 1 Aproximación de diseño básico del proceso de inmovilización por unión covalente de Alcalasa con esferas de quitosano con glutaraldehído activado para llevar a cabo la hidrólisis de huesos de pollo



En el gráfico 1, de producción propia, se describe la aproximación del diseño básico del proceso de inmovilización por unión covalente de Alcalasa con esferas de quitosano con glutaraldehído activado para llevar a cabo la hidrólisis de huesos de pollo. El procedimiento para el pretratamiento del hueso de pollo fue extraído de (Dong *et al.*, 2019) que realizó hidrólisis con Alcalasa libre, sin embargo, el proceso de inmovilización no afecta el pretratamiento del hueso. Por su parte, la serie de pasos de activación del soporte de quitosano y las condiciones de hidrólisis se obtuvieron de (Kimberle *et al.*, 2020).

CONCLUSIÓN

Según el análisis bibliométrico realizado se encontró que a pesar de las investigaciones con Alcalasa inmovilizada se realizan desde el año 1970, el interés científico por su uso en la hidrólisis no ha presentado crecimiento significativo, lo que limitó el análisis posterior por la poca cantidad de artículos encontrados. Se relacionó las propiedades fisicoquímicas de los huesos de pollo con otras

materias primas empleadas en la obtención de hidrolizados con diferentes metodologías de inmovilización de Alcalasas encontrando que a pesar de que los péptidos obtenidos de diferentes matrices puedan exhibir las mismas funcionalidades, la diferencia estructural es importante al momento de analizar que técnica de inmovilización llevar a cabo. Por lo que, se analizaron las técnicas aplicadas a proteínas fibrilares con el fin de tener un referente de resultados de hidrólisis con enzimas inmovilizadas, con propiedades y estructura similar al sustrato de interés. Al contrastar ventajas y desventajas de las metodologías de inmovilización de Alcalasas disponibles se encontró que la unión covalente multipunto con esferas de quitosano con glutaraldehído es potencialmente la mejor opción para ser aplicada en la hidrólisis de huesos de pollo para la obtención de polipéptidos bioactivos. Esto teniendo en cuenta que es quien operacionalmente presente más ventajas, de manera cualitativa, además de ser usada en diferentes sustratos, obteniendo siempre buenos resultados en la hidrólisis de proteínas, exhibiendo altos grados de hidrólisis, alta actividad residual y capacidad antioxidante. También considerando que el método de inmovilización elegido no representa altos costos, teniendo en cuenta que además de proporcionar un biocatalizador activo, es una operación relativamente simple que no requiere varios pasos para la activación del soporte o un soporte costoso que puede no estar disponible comercialmente.

RETOS Y OPORTUNIDADES

Teniendo en cuenta que la información acerca de las técnicas de inmovilización de enzimas para la obtención de péptidos no es un tema que este altamente disponible en la comunidad científica, con el fin de llevar a cabo el diseño de experimentos para seleccionar la metodología que más se acople al sustrato de interés, será necesario llevar a cabo el análisis de la conversión de diferentes materias primas. Además, es necesario tener en cuenta que a pesar de la sugerencia teórica de llevar a cabo la unión covalente multipunto con esferas de quitosano con glutaraldehído, diferentes condiciones de soporte e inmovilización producen biocatalizadores que presentan diferentes especificidades y estabildades, que podrían ser empleados de acuerdo con las necesidades del investigador. Sin embargo, la investigación alrededor de este tema abriría las puertas a la obtención de proteínas desde medios que normalmente son tratados como desperdicios, lo cual tendría un impacto positivo en la cadena de valorización en los subproductos agrícolas y un aporte significativo a nivel ambiental, evitando filtración de lixiviados sobre los terrenos y a la producción de gases de efecto invernadero.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, K., Yazdani, F., & Panahi, R. (2017). Covalent immobilization of tyrosinase onto cyanuric chloride crosslinked amine-functionalized superparamagnetic nanoparticles: Synthesis and characterization of the recyclable nanobiocatalyst. *International Journal of Biological Macromolecules*, *94*, 396–405. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.10.058>
- Abdulkhani, A., Alizadeh, P., Hedjazi, S., & Hamzeh, Y. (2017). Potential of Soya as a raw material for a whole crop biorefinery. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *75*, 1269–1280. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.10.082>
- Adeva-Andany, M. M., Fernández-Fernández, C., Carneiro-Freire, N., Vila-Altesor, M., & Ameneiros-Rodríguez, E. (2022). The differential effect of animal versus vegetable dietary protein on the clinical manifestations of diabetic kidney disease in humans. *Clinical Nutrition ESPEN*, *48*, 21–35. <https://doi.org/10.1016/J.CLNESP.2022.01.030>
- Amiza, M. A., Kong, Y. L., & Faazaz, A. L. (2012). Effects of degree of hydrolysis on physicochemical properties of Cobia (*Rachycentron canadum*) frame hydrolysate. *International Food Research Journal*, *19*(1), 199–206.

- Arévalo Bohórquez, V. D. (2014). PERSPECTIVA DE LA PRODUCCIÓN AVÍCOLA EN COLOMBIA. *UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA*, 148, 148–162.
- Ashtar, M. (2020). (PDF) *Hydrolysis of the protein content of poultry slaughterhouse waste using alcalase enzyme in the fixed-bed system*.
https://www.researchgate.net/publication/345410347_Hydrolysis_of_the_protein_content_of_poultry_slaughterhouse_waste_using_alcalase_enzyme_in_the_fixed-bed_system
- Aspevik, T., Ge Oterhals, A. °, Sissel, Rønning, B., Themis Altintzoglou, Sileshi, Wubshet, G., Gildberg, Asbjørn, Nils, Afseth, K., Ragnhild, Whitaker, D., & Lindberg, D. (n.d.). *Valorization of Proteins from Co-and By-Products from the Fish and Meat Industry*.
<https://doi.org/10.1007/s41061-017-0143-6>
- Bhandari, D., Rafiq, S., Gat, Y., Gat, P., Waghmare, R., & Kumar, V. (2020). A Review on Bioactive Peptides: Physiological Functions, Bioavailability and Safety. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26(1), 139–150. <https://doi.org/10.1007/s10989-019-09823-5>
- 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>
- Chalabi, M., Khademi, F., Yarani, R., & Mostafaie, A. (2014). Proteolytic activities of kiwifruit actinidin (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) on different fibrous and globular proteins: A comparative study of actinidin with papain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(8), 4025–4037. <https://doi.org/10.1007/S12010-014-0812-7/TABLES/2>
- Chen, Z., Wang, X., Chen, Y., Xue, Z., Guo, Q., Ma, Q., & Chen, H. (2018). Preparation and characterization of a novel nanocomposite with double enzymes immobilized on magnetic Fe₃O₄-chitosan-sodium tripolyphosphate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 169, 280–288. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.04.066>
- Cui, Y., Yang, L., Lu, W., Yang, H., Zhang, Y., Zhou, X., Ma, Y., Feng, J., & Shen, Q. (2021). Effect of steam explosion pretreatment on the production of microscale tuna bone powder by ultra-speed pulverization. *Food Chemistry*, 347, 129011.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129011>
- De Greef, E., Hauser, B., Devreker, T., Veereman-Wauters, G., & Vandenplas, Y. (2012). Diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *World Journal of Pediatrics* 2011 8:1, 8(1), 19–24. <https://doi.org/10.1007/S12519-012-0332-X>
- de Queiroz, A. L. M., Bezerra, T. K. A., de Freitas Pereira, S., da Silva, M. E. C., de Almeida Gadelha, C. A., Gadelha, T. S., Pacheco, M. T. B., & Madruga, M. S. (2017). Functional protein hydrolysate from goat by-products: Optimization and characterization studies. *Food Bioscience*, 20, 19–27. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2017.07.009>
- Dong, Z. Y., Li, M. Y., Tian, G., Zhang, T. H., Ren, H., & Quek, S. Y. (2019). Effects of ultrasonic pretreatment on the structure and functionality of chicken bone protein prepared by enzymatic method. *Food Chemistry*, 299, 125103.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125103>

- Dussán, K. (2008). Inmovilización de enzimas en nanoestructuras magnéticas para aplicaciones industriales kelly johana dussán medina universidad nacional de colombia sede manizales facultad de ingeniería y arquitectura maestría en ingeniería-ingeniería química Manizales, Mayo de 2008. *Repositorio UNAL*.
- Fagbemi, O. D., & Sithole, B. (2021). Evaluation of waste chicken feather protein hydrolysate as a bio-based binder for particleboard production. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4, 100168. <https://doi.org/10.1016/J.CRGSC.2021.100168>
- FAO. (2022). *Manejo de los desechos avícolas | Producción y productos avícolas | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/management-and-housing/waste-management/es/>
- Federación Nacional de Avicultores de Colombia, F. (2018). *Federación nacional de avicultores de colombia-Fenavi*. 260, 6. www.fenavi.org
- Figuerola, O., Zapata, J., & Gutierrez, A. (2012). *MODELAMIENTO DE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS DEL PLASMA BOVINO*. Revista EIA. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372012000100007
- Ghosh, S., Gillis, A., Shevirvov, J., Levkov, K., & Golberg, A. (2019). Towards waste meat biorefinery: Extraction of proteins from waste chicken meat with non-thermal pulsed electric fields and mechanical pressing. *Journal of Cleaner Production*, 208, 220–231. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2018.10.037>
- Gil Cano, F. (n.d.). *ANATOMÍA ESPECÍFICA DE AVES: ASPECTOS FUNCIONALES Y CLÍNICOS*. Retrieved May 21, 2022, from <http://www.um.es/anatvet/interactividad/aaves/indexc.htm>
- Gisbert, V. G., Benaglia, S., Uhlig, M. R., Proksch, R., & Garcia, R. (2021). High-Speed Nanomechanical Mapping of the Early Stages of Collagen Growth by Bimodal Force Microscopy. *ACS Nano*, 15(1), 1850–1857. https://doi.org/10.1021/ACSNANO.0C10159/SUPPL_FILE/NNOC10159_SI_005.AVI
- Glomm, W. R., Wubshet, S. G., Lindberg, D., Dankel, K. R., Afseth, N. K., Stenstad, P. M., & Johnsen, H. (2021b). Immobilized protease on magnetic particles for enzymatic protein hydrolysis of poultry by-products. *LWT*, 152, 112327. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112327>
- Guisan, J. (2013). *Immobilization of Enzymes and Cells* (J. M. Guisan (ed.); Vol. 1051). Humana Press. <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>
- He, W., Tian, L., Fang, F., Chen, D., Federici, E., Pan, S., & Jones, O. G. (2021). Limited hydrolysis and conjugation of zein with chitosan oligosaccharide by enzymatic reaction to improve functional properties. *Food Chemistry*, 348, 129035. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129035>
- J.A, S., Lizardi, J., Ramirez, J. ., García, G., Ezquerro, J. ., Valenzuela, E. ., Carvallo, M. ., Lugo, M. ., & Pacheco, R. (2014). Utilizacion de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilizacion de proteasas: efectos en su estabilizacion y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*.

- Jonović, M., Žuža, M., Đorđević, V., Milivojević, M., Bugarski, B., & Knežević-Jugović, Z. (2019). Hydrolysis of the Egg White and Soy Proteins by the Alcalase-Alginate-EE Biocatalyst. *46th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering, Tatranské Matliare, December*, 51–59. isbn: 978-80-8208-011-0, EAN: 9788082080110
- Jonović, M., Žuža, M., Đorđević, V., Šekuljica, N., Milivojević, M., Jugović, B., Bugarski, B., & Knežević-Jugović, Z. (2021). Immobilized Alcalase on Micron- and Submicron-Sized Alginate Beads as a Potential Biocatalyst for Hydrolysis of Food Proteins. *Catalysts 2021, Vol. 11, Page 305, 11(3)*, 305. <https://doi.org/10.3390/CATAL11030305>
- Kasper, J. R., Andrews, E. C., & Park, C. (2014). Product inhibition in native-state proteolysis. *PLoS ONE, 9(10)*, 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111416>
- Kimberle, P. dos S., Carolina, M. S., Ana, I. S. B., & Luciana, R. B. G. (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>
- Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2018a). 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>
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Sigoillot, J. C., & Fine, F. (2012). Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology 2012 95:5, 95(5)*, 1105–1114. <https://doi.org/10.1007/S00253-012-4250-6>
- Memon, A. H., 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, 289*, 568–574. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.03.096>
- Meyers, M. A., Chen, P. Y., Lin, A. Y. M., & Seki, Y. (2008). Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science, 53(1)*, 1–206. <https://doi.org/10.1016/J.PMATSCI.2007.05.002>
- Mineducación, V. (n.d.). *GUÍA PARA LA VISUALIZACIÓN DE DATOS: Bibliometrix Dirección de Bibliotecas*.
- Montesano, D., Gallo, M., Blasi, F., & Cossignani, L. (2020). Biopeptides from vegetable proteins: new scientific evidences. *Current Opinion in Food Science, 31*, 31–37. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2019.10.008>
- Moo-Young, M. (2011). Enzyme Bioreactors. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 2, pp. 319–329). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00099-4>
- Mora, N., & Jaimes, C. (n.d.). *ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS*.
- Moussa, M., Babilé, R., Fernandez, X., & Rémygnon, H. (2007). Biochemical and biomechanical properties of tendons in two commercial types of chickens. *Animal, 1(7)*, 983–988. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000183>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Ombra, M. N., d’Acierno, A., & Coppola, R. (2018). Recovery of biomolecules of high benefit from food waste. *Current Opinion in Food Science, 22*, 43–54.

<https://doi.org/10.1016/J.COFS.2018.01.012>

- Niu, L., Zhou, X., Yuan, C., Bai, Y., Lai, K., Yang, F., & Huang, Y. (2013). Characterization of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin extracted with alkaline and different acid pretreatments. *Food Hydrocolloids*, *33*(2), 336–341. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2013.04.014>
- Novozymes. (2016). Proteases for biocatalysis. *Novoenzymes*, 1–6.
- Pessato, T. B., de Carvalho, N. C., 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. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.02.015>
- Puech, J., Tutores, M., Berna, :, Prieto, S., Carlos, J., & Valcarcel, C. (2014). *Efecto de ultrasonificación de alta potencia en las propiedades de un nanocomposite de matriz epoxi reforzado con sílice*. Universidad Carlos III de Madrid.
- Rocha, G. F., Kise, F., Rosso, A. M., & Parisi, M. G. (2017). Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa origanifolia* fruits. *Food Chemistry*, *237*, 350–355. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.05.112>
- Rojas, H. A., Martínez, J. J., Vargas, A. Y., & Sólidos magnéticos tipo Fe, R. (2014). *Selección de soportes magnéticos para la inmovilización de Ureasa Magnetic supports selection for Urease immobilization*. *16*(2), 289–296.
- Sampath Kumar, N. S., Nazeer, R. A., & Jaiganesh, R. (2011). Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids* *2011* *42*:5, *42*(5), 1641–1649. <https://doi.org/10.1007/S00726-011-0858-6>
- Sampson, H. A., & York, N. (2001). Utility of food-specific IgE concentrations in predicting symptomatic food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *107*(5), 891–896. <https://doi.org/10.1067/MAI.2001.114708>
- Santiago, A. :, Cabo, C., Pérez, É., Cotutores, E., Barat, J. M., Héctor, B., & Llorente, G. (n.d.). *UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL (ETSIAMN) Nuevos métodos y soportes para la inmovilización de enzimas*.
- Sharma, G. M., & Rallabhandi, P. (2015). The Effects of Processing on Gluten from Wheat, Rye, and Barley, and its Detection in Foods. *Processing and Impact on Active Components in Food*, 303–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00036-6>
- Shen, C.-H. (2019). Gene Expression: Translation of the Genetic Code. *Diagnostic Molecular Biology*, 87–116. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00004-3>
- Sierra-Lopera, L. M., & Zapata-Montoya, J. E. (2021). Optimization of enzymatic hydrolysis of red tilapia scales (*Oreochromis* sp.) to obtain bioactive peptides. *Biotechnology Reports*, *30*, e00611. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2021.E00611>
- Siswoyo, T. A., Arum, L. S., Sanjaya, B. R. L., & Aisyah, Z. S. (2021). The growth responses and antioxidant capabilities of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) in different durations of drought stress. *Annals of Agricultural Sciences*, *66*(1), 81–86.

<https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2021.05.003>

- Sommaruga, S., Galbiati, E., Peñaranda-Avila, J., Brambilla, C., Tortora, P., Colombo, M., & Prospero, D. (2014). Immobilization of carboxypeptidase from *Sulfolobus solfataricus* on magnetic nanoparticles improves enzyme stability and functionality in organic media. *BMC Biotechnology*, *14*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-82/FIGURES/5>
- Sousa de Oliveira, T., Freitas-Silva, O., Mendonça Kluczkovski, A., & Henrique Campelo, P. (2020). Potential use of vegetable proteins to reduce Brazil nut oil oxidation in microparticle systems. *Food Research International*, *137*, 109526. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109526>
- Sun, S., Gao, Y., Chen, J., & Liu, R. (2022). Identification and release kinetics of peptides from tilapia skin collagen during alcalase hydrolysis. *Food Chemistry*, *378*, 132089. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132089>
- 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>
- Tamayo Rojas, M. (2014, July). *Propuesta de manual técnico para el manejo y aprovechamiento de residuos orgánicos avícolas generados en el proceso de producción de huevos*. [https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10637/PROYECTO DE GRADO MILENA TAMAYO.pdf?sequence=1](https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10637/PROYECTO%20DE%20GRADO%20MILENA%20TAMAYO.pdf?sequence=1)
- Tapal, A., & Tiku, P. K. (2018). Nutritional and nutraceutical improvement by enzymatic modification of food proteins. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00027-X>
- Valencia, P., Pinto, M., & Almonacid, S. (2014). Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry*, *49*(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2013.11.012>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.03.023>
- Wang, S. nan, Zhang, C. ran, Qi, B. kun, Sui, X. nan, Jiang, L. zhou, Li, Y., Wang, Z. jiang, Feng, H. xia, Wang, R., & Zhang, Q. zhi. (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. <https://doi.org/10.1007/S00217-014-2301-1/FIGURES/10>
- Wang, Y., Chen, H., Wang, J., & Xing, L. (2014). Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate–chitosan beads. *Process Biochemistry*, *49*(10), 1682–1690. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2014.07.002>
- Wieser, H. (2008). Detection of gluten. *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, 47–80. <https://doi.org/10.1016/B978-012373739-7.50005-8>
- Xie, C., Li, W., Gao, R., Yan, L., Wang, P., Gu, Z., & Yang, R. (2022). Determination of glucosinolates in rapeseed meal and their degradation by myrosinase from rapeseed sprouts. *Food Chemistry*, *382*, 132316. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132316>

- Xue, P., Sun, N., Li, Y., Cheng, S., & Lin, S. (2018). Targeted regulation of hygroscopicity of soybean antioxidant pentapeptide powder by zinc ions binding to the moisture absorption sites. *Food Chemistry*, 242, 83–90. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.09.025>
- 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. <https://doi.org/10.1002/JSFA.7712>
- Ye, Q., Chen, K., Yang, X., Xiao, K., & Shen, Y. (2021a). Facile and moderate immobilization of proteases on SPS nanospheres for the active collagen peptides. *Food Chemistry*, 335, 127610. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2020.127610>
- Zeng, Q., Li, Q., Sun, D., & Zheng, M. (2020). Alcalase Microarray Base on Metal Ion Modified Hollow Mesoporous Silica Spheres as a Sustainable and Efficient Catalysis Platform for Proteolysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 565. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00565/BIBTEX>
- Zhan, G., Zong, W., Ma, L., Wei, J., & Liu, W. (2022). Biomechanical properties of ready-to-harvest rapeseed plants: Measurement and analysis. *Information Processing in Agriculture*. <https://doi.org/10.1016/J.INPA.2022.04.002>
- Zhang, A.-Q., Li, X.-Y., Han, Y.-N., Liu, B.-H., Zhang, H.-L., Gao, J.-H., & Zhang, Y.-H. (2022). Improving interface properties of zein hydrolysis and its application in salad dressing through dispersion improvement assisted by potassium oleate aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 130, 107719. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.107719>
- Zhao, D., Pu, Z., Su, Q., Zhang, Y., Sun, W., & Bao, Y. (2022). Self-assembled κ-carrageenase-inorganic hybrid nanoflowers exerting high catalytic efficiency with stable and recyclable properties. *Enzyme and Microbial Technology*, 153, 109957. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2021.109957>
- 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. <https://doi.org/10.1007/S00449-017-1826-7/FIGURES/7>