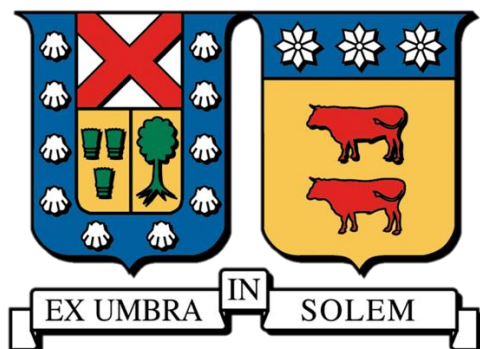


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL

SANTIAGO – CHILE



“CINÉTICA DE CATÁLISIS ENZIMÁTICA DE UN SUSTRATO INSOLUBLE:
HUESO DE SALMÓN BAJO MICRO-MOLIENDA”

PÍA SOFÍA GONZÁLEZ MEZA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE:
MAGÍSTER CIENTÍFICO TECNOLÓGICO
EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA

PROFESOR GUÍA:

DR. SERGIO FELIPE ALMONACID MERINO

PROFESOR/ES CORREFERENTE/S:

DR. PEDRO VALENCIA ARAYA

DRA. SULEIVYS NUÑEZ GONZÁLEZ

Octubre – 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): Memoria o trabajo de título Tesis de Postgrado
Título del trabajo: Cinética de catálisis enzimática de un sustrato insoluble: hueso de salmón bajo micro-molienda
Nombre del candidato(a): Pía Sofía González Meza
Carrera / Grado: Magíster en Ciencias de la Ingeniería Química
Campus: San Joaquín **Departamento:** Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Sergio Felipe Almonacid Merino, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente **DEJO CONSTANCIA** que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

El trabajo **CONTIENE** información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

6 meses 12 meses 2 años 3 años 5 años 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):

4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 04-11-2025

Firma: 

Estudiante o Candidato(a):

Fecha: 04-11-2025

Firma: 

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

Resumen

El salmón es uno de los principales peces de acuicultura en Chile. Para contribuir en el desarrollo sostenible de esta industria se deben incorporar alternativas que generen un beneficio medioambiental, social y económico. Los esquelones son un importante subproducto del proceso de fileteado, ya que representan alrededor del 10% en peso del pescado. Estos están compuestos principalmente por músculo y hueso. La fracción ósea del esquelón, además de colágeno, posee un alto contenido de calcio, mineral deficitario en la dieta contemporánea. El hueso puede ser transformado en un ingrediente funcional mediante la aplicación secuencial de micro-molienda ($d_{50} = 10[\mu\text{m}]$) e hidrólisis enzimática (Alcalase 2.5L), favoreciendo así la solubilización de Ca^{+2} y la formación de péptidos. Los modelos que generalmente son utilizados para describir la cinética de catálisis son Michaelis-Menten (MM) y Reversa de Michaelis-Menten (RMM), válidos para los casos en que $E_0 < S_0 + K_m$ (1) y $S_0 \ll E_0 + K_m$ (2), respectivamente. Dado que para sustratos sólidos la concentración molar S_0 o de sitios accesibles en superficie (sitios de ataque) suele ser desconocida, no es trivial decidir cuál de estas condiciones es la indicada, y por consiguiente cuál debería ser el modelo a utilizar. Otro modelo que ha sido propuesto es el de conservación de sustrato (CS) que sería válido para ambas condiciones, (1) y (2). Independiente del modelo que se utilice, todos ellos implican una rápida formación del complejo ES, seguido de un prolongado período en que $d(ES) / dt \approx 0$, conocida esta como la condición de *Quasi Steady State* (QSS). La utilización y validación experimental de estos modelos requieren entonces de dos elementos fundamentales:

- Para aplicar cualquiera de estos modelos es necesario garantizar que la velocidad inicial de reacción sea medida cuando se haya alcanzado QSS. Esto en catálisis de sistemas homogéneos es prácticamente instantáneo ($t = 0$), pero no necesariamente cierto cuando el sustrato es un sólido con una geometría y estructura compleja.
- Como el sustrato sólido es normalmente aplicado en términos de concentración másica [g L^{-1}], es necesario introducir un parámetro que estime la relación entre la concentración molar disponible de los sitios de ataque y la carga másica del sustrato, $\Gamma[\text{mol}_{\text{sustrato}} \text{g}_{\text{sustrato}}^{-1}]$, requiriéndose entonces la estimación de tres parámetros cinéticos: k_2 (constante de velocidad catalítica, tasa máxima de conversión del complejo ES a producto, por enzima), K_m (constante de Michaelis, indicador de afinidad enzima-sustrato), Γ (parámetro de accesibilidad, moles de sitios de ataque por unidad de masa de sustrato).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento de la cinética en fase heterogénea en medio acuoso de micropartículas de hueso obtenido a partir de esquelón de salmón, estudiando la validez del modelo CS, por medio de la caracterización y el análisis experimental. Se midió formación de producto en el tiempo mediante valoración por pH-Stat. Se obtuvo que el valor de los parámetros cinéticos es de $\Gamma = 9.7 \times 10^{-2} \pm 5.5 \times 10^{-3} [\mu\text{mol g}^{-1}]$, $K_m = 4.50 \pm 1.59 [\mu\text{M}]$, mediante ajustes de regresión no lineal al modelo CS, y $k_2 = 8.49 \pm 0.49 [\text{s}^{-1}]$ obtenido a partir de la medición de enzima libre en la fase soluble de la reacción a tQSS. Se resuelve que la proteína de hueso de salmón es un sustrato conservante, y que el modelo CS describe la cinética en fase heterogénea de este sustrato mediante la acción proteolítica de Subtilisina (Alcalase 2.5L).

Índice de contenido

Índice de contenido.....	4
Índice de figuras	5
Índice de tablas	8
1 Introducción.....	9
2 Antecedentes	12
2.1 Desarrollo sostenible.....	12
2.2 Industria del salmón.....	12
2.2.1 Producción mundial de salmón	13
2.2.2 Producción de salmón en Chile	14
2.2.3 Residuos de la industria del salmón	15
2.2.4 Marco legal para la eliminación y aprovechamiento de residuos pesqueros.....	16
2.3 Nutraceuticos y Alimentos Funcionales	17
2.4 Hidrólisis de proteínas	18
2.4.1 Hidrólisis química	18
2.4.2 Hidrolizados enzimáticos de proteínas de pescado	20
2.4.3 Técnica de titulación del sitio activo	21
2.4.4 Procesamiento del esquelón de salmón para la obtención de micropartículas de hueso de salmón con tamaño d50 = 10µm	22
2.4.5 Análisis y caracterización de la hidrólisis enzimática:	23
2.4.6 Modelos de catálisis enzimática	26
3 Materiales y métodos.....	33
3.1 Metodología y diseño experimental.....	33
3.1.1 Consideraciones preliminares para experimentos con hueso de salmón d50 = 10 [µm]	35
3.2 Métodos	35
3.2.1 Titulación del sitios activos en Alcalase 2.5L (Subtilisina)	35
3.2.2 Hidrólisis enzimática.....	37
3.2.3 Estimación de tiempo inicial de <i>QSS</i>	39
3.2.4 Estimación de tiempo inicial de <i>QSS</i> mediante filtro de suavizado y diferenciación de Savitzky-Golay (savgol).....	41
3.2.5 Herramientas de cálculo y análisis de regresión.....	42
4 Resultados y Discusión.....	45
4.1 Concentración molar de Subtilisina en Alcalase 2.5L	45
4.2 Tiempo al cual se verifica <i>Quasi Steady State (QSS)</i>	45
4.3 Protocolo experimental para encontrar los parámetros cinéticos del modelo CS (k₂, K_m, y Γ)	49
4.3.1 Experimentos para análisis de Michaelis-Menten (MM)	49
4.3.2 Experimentos para análisis de Reversa de Michaelis-Menten (RMM).....	50

4.3.3	Procedimiento seleccionado para establecer el protocolo experimental para encontrar los parámetros cinéticos del modelo CS (k_2 , K_m , y Γ).....	51
4.4	Estimación de parámetros cinéticos (k_2 , K_m , y Γ) mediante el modelo de conservación de sustrato (CS).....	52
5	Conclusiones.....	56
6	Referencias	57
7	Anexos.....	60
7.1	Densidad de la mezcla de reacción en función de la masa de hueso de salmón $d_{50} = 10$ [μm].....	60
7.2	Curvas de progreso y tasa de formación de producto	62

Índice de figuras

Figura 2-1:	Producción mundial promedio, en periodos de 5 años, de salmón atlántico. Datos obtenidos de (FAO, 2022).	13
Figura 2-2:	Reacción de ruptura / formación del enlace peptídico en una proteína.	18
Figura 2-3:	Balance teórico de masa en una línea de fileteado de salmón para estimar el rendimiento de calcio que se podría obtener.	20
Figura 2-4:	Mecanismo de reacción de la Serina (Ser) catalíticamente activa de la Subtilisina (Sub), con una molécula de PMSF, para formar un intermediario acil-enzima estable y sin actividad de Sub.	21
Figura 2-5:	Diagrama de flujo de los procesos para la obtención de polvo de hueso de salmón con tamaño de partícula medio de 10 [μm].	22
Figura 2-6:	Proceso del tratamiento del hueso, posterior a la etapa de hidrolizado. (1) Materia prima (hueso hidrolizado). (2) Cocción de hueso de salmón en olla a presión. (3) Se separa el hueso sólido, del líquido luego de la etapa de cocción. (4) Una vez separado el hueso de la fase líquida se procede a una molienda con minipimer, donde se forma una pasta. (5) Se dispone la pasta de hueso en una bandeja de estufa. (6) El hueso es secado a 105 [$^{\circ}\text{C}$] durante 2 horas. (7) Lámina de pasta de hueso luego del proceso de secado, se forman hojuelas. (8) las hojuelas pasan al proceso de micro molienda en molino planetario. (9) El producto de la molienda es tamizado en tamiz No. 40. (10) Hueso de salmón $d_{50}=10$ [μm].	22
Figura 2-7:	Esquema de instalación experimental para el método de valoración con pH-Stato. Obtenido y traducido de (Kristinsson & Rasco, 2000).	24
Figura 2-8:	Modelo de conservación de sustrato para una enzima degradando un sólido (elaboración propia).	28
Figura 2-9:	Fracción de enzima HjCel7A adsorbida sobre Avicel (parte superior) y concentración de producto formado (parte inferior) en función del tiempo, a una concentración enzimática de 500 nM y carga de sustrato de 50 g/L. Las líneas sólidas fueron añadidas para guiar la visualización de los datos experimentales (Kari et al., 2017).	31
Figura 2-10:	Curvas de progreso y tasas derivadas para dos celulasas (TrCel7A y TrCel6A) actuando sobre celulosa microcristalina (Avicel) a 25 $^{\circ}\text{C}$. Los paneles ilustran experimentos bajo condiciones de saturación de sustrato (paneles A y C) y saturación de enzima (paneles B y D), obtenidos al variar la carga de sustrato o la concentración enzimática	

respectivamente. Para el análisis de tasas, los autores utilizaron un ajuste tipo $P(t)=At^B$, cuya derivada proporciona una estimación continua de la velocidad de reacción dP/dt (Kari et al., 2019).....	32
Figura 3-1: Esquema de metodología para abordar cada objetivo específico de la investigación.....	33
Figura 3-2: Matriz semisólida, plástica, y moldeable, con 50% p/p de hueso $d_{50} = 10 \mu\text{m}$ en una mezcla hueso-agua.....	35
Figura 3-3: Preparación de muestras para curva de titulación de Subtilisina con PMSF.....	36
Figura 3-4: Montaje experimental para llevar a cabo las hidrólisis enzimáticas y la valoración de grupos $\alpha\text{-NH}_3$ mediante pH-stato, utilizando baño termostático y el equipo Mettler-Toledo G20.....	38
Figura 3-5: Espectro de medido (azul) y datos suavizados de savgol con ancho de filtro $w=\{7,15,27\}$, y oren polinomial $o=2$ (Gallagher, s. f.).....	41
Figura 4-1: Ensayo de actividad para titular la concentración de enzima presente en el preparado enzimático Alcalase 2.5L.....	45
Figura 4-2: Fracción de enzima Alcalase 2.5L (Subtilisina) adsorbida sobre proteína contenidas en micropartículas de hueso de salmón ($d_{50} = 10 [\mu\text{m}]$) (parte superior) y concentración de producto formado (parte inferior) en función del tiempo, a una concentración inicial enzimática de $3.81 \mu\text{M}$ y carga inicial de sustrato de 30 g L^{-1} . Las líneas sólidas fueron añadidas para guiar la visualización de los datos experimentales. La línea punteada azul representa el tiempo en el que ocurre un salto en el comportamiento de la formación de complejo enzima-sustrato (t_{jump}), la línea punteada roja representa el tiempo donde se considera el inicio del QSS (t_{QSS}).....	47
Figura 4-3: Obtención de t_{jump} y t_{QSS} mediante el filtro de SG para los experimentos a una concentración inicial enzimática de $3.81 \mu\text{M}$ y carga inicial de sustrato de 30 g L^{-1}	48
Figura 4-4: t_{QSS} obtenidos mediante el análisis numérico (SG) para los experimentos con el enfoque de RMM.....	48
Figura 4-5: En el panel A se muestran los ajustes del modelo de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de v_{ss} en QSS para cada E_0 . En el panel B se muestran los mismos ajustes, normalizado por E_0 . Considerar para el panel B que en el eje de las ordenadas izquierdo se leen los valores de v_{ss}/E_0 para la concentración $7.63 \times 10^{-1} \mu\text{M}$, y las demás concentraciones se leen en el derecho.....	49
Figura 4-6: En el panel A se muestra el ajuste del modelo de Reversa de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de v_{ss} en QSS . En el panel B se muestran el mismo ajuste, normalizado por S_0	50
Figura 4-7: Resultados experimentales para estimar k_2 mediante la medición de enzima libre en QSS	51
Figura 4-8: Ajuste del modelo RMM a los datos experimentales mediante regresión no lineal, con $k_2 = 8.49 \pm 0.49 \text{ s}^{-1}$ obtenido mediante la cuantificación de E_{free} , QSS	52
Figura 4-9: Ajuste del modelo CS para obtener Γ y K_m , con $k_2 = 8.49 \pm 0.49 \text{ s}^{-1}$ obtenido mediante la cuantificación de E_{free} , QSS . Las líneas punteadas representan el intervalo de predicción del modelo con un 95% de certeza.....	53
Figura 4-10: Superficie de respuesta del modelo CS junto a los datos experimentales de esta investigación. En el cuarto panel se presenta el análisis de predicción de modelo frente a los datos experimentales.....	55

Figura 7-1: (a) Muestra de reacción sin agitación; (b) Muestra de reacción sometida a agitación.	60
Figura 7-2: Densidad de la mezcla de reacción para los experimentos de hidrólisis enzimática de proteína de hueso de salmón con Alcalase 2,5L, en función de la masa de hueso de salmón añadido para una masa de mezcla de reacción total de 80 [g].....	61
Figura 7-3: Curvas de progreso y tasa de formación de producto para los diferentes experimentos.....	62

Índice de tablas

Tabla 2-1: Exportaciones Nacionales en base a varias categorías para Salmón atlántico, Coho y Trucha en el periodo enero-junio 2023 (SalmonChile, 2023).	14
Tabla 2-2: Valores promedio de diversos residuos en el procesamiento de diversas especies de pescado expresados en porcentaje del peso total del pescado (FAO, 2022).	15
Tabla 2-3: Factor de conversión para obtener la tasa de proteína bruta a partir del nitrógeno total (García Martínez & Fernández Segovia, s. f.).	25
Tabla 3-1: Variables para cada procedimiento experimental.	34
Tabla 4-1: Parámetros obtenidos del ajuste al modelo de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de vss en QSS para cada $E0$	50
Tabla 4-2: Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste al modelo de Reversa de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de vss en QSS	51
Tabla 4-3: Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste al modelo de Reversa de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de vss en QSS , con $k_2 = 8.49 \pm 0.49 \text{ s}^{-1}$ obtenido mediante la cuantificación de Efree, QSS	52
Tabla 4-4: Parámetros cinéticos del modelo CS ajustado mediante regresión no lineal para los datos experimentales con enfoque en RMM $k_2 = 8.49 \pm 0.49 \text{ s}^{-1}$	53
Tabla 4-5: Valores de Γ para celulosa (Kari et al., 2017) y proteína de hueso de salmón ($d_{50} = 10 \text{ }[\mu\text{m}]$).	54

1 Introducción

La industria alimentaria reconoce la importancia de considerar los objetivos del desarrollo sostenible. Esto implica realizar proyectos que promuevan la salud y el cuidado del medio ambiente, manteniendo la competitividad económica en el mercado global. Para alcanzar este objetivo, se pueden incorporar tecnologías de procesamiento que reduzcan el consumo de agua y energía, así como valorizar los residuos o subproductos (Naciones Unidas, 2018).

En Chile, la industria productora de salmón es una de las más importantes en el ámbito pesquero y alimentario, alcanzando una producción de más de 700 mil toneladas al año en el periodo del 2024 (Consejo Del Salmón Chile, 2024), posicionando al país en el segundo lugar a nivel mundial, después de Noruega, en producir y exportar salmón (FAO, 2022). La revalorización de los residuos pesqueros del salmón en Chile se vuelve fundamental para fomentar la sostenibilidad de esta industria, ya que es sabido que estos podrían generar un beneficio en la salud de los consumidores por su importante valor nutricional, además de incorporarles valor económico.

En una típica línea de fileteado de salmónes, los filetes son aproximadamente el 60% del peso del salmón completo, mientras que uno de los principales productos derivados son los esquelones, una matriz compuesta de músculo adherido y hueso, que representan un 10% del peso inicial. Este residuo suele ser empleado para la producción de otros subproductos de bajo valor como, por ejemplo, la harina de pescado cuyo uso principal es como pienso para la alimentación animal. Sin embargo, nutrientes como el calcio y el colágeno presentes en la fracción ósea del esquelón podrían ser aprovechados para la alimentación humana, cuya dieta hoy en día es deficitaria en calcio. Estudios han evidenciado que el calcio proveniente del hueso de salmón es absorbido de manera eficiente en el organismo humano (Malde et al., 2010), y que además, si el calcio es quelado por péptidos de colágeno genera un efecto positivo en la biodisponibilidad de este mineral, permitiendo una interacción efectiva en el sistema gastrointestinal para su absorción (Li et al., 2020). La disponibilidad de esquelones de salmón podrían alcanzar las 70 mil toneladas anuales y 8.400,0 ton de hueso (app 12% del esquelon).

Una alternativa para procesar y dar valor al hueso de salmón es la aplicación de tecnología enzimática, que en condiciones controladas de pH y temperatura genera péptidos de colágeno a partir de hueso previamente sometido a un proceso de molienda, lo que puede generar un impacto importante en la solubilidad del calcio, además del efecto quelante de los péptidos y aminoácidos libres (Pérez et al., 2024). Esto implica una hidrólisis enzimática a partir de un sustrato sólido suspendido en medio acuoso.

En el ámbito de la tecnología enzimática, los estudios cinéticos de la catálisis constituyen la base elemental de la bioquímica cuantitativa, necesarios para el desarrollo tanto de la comprensión fundamental como de las aplicaciones de las enzimas en el nivel tecnológico. La mayor parte de la investigación en este ámbito se refiere a reacciones homogéneas en medio acuoso. Se postula que las enzimas, los sustratos y los productos son especies disueltas y que la velocidad de su inter-conversión puede describirse mediante ecuaciones de velocidad convencionales. La reacción enzimática más elemental puede describirse mediante el siguiente esquema micro-cinético:



Este esquema de reacción, bajo la aplicación de la ley de acción másica y bajo las premisas (a) y (b), conduce a la bien conocida ecuación de Michelis-Menten (MM):

$$v_{ss}^{MM} = \frac{k_2 E_0 S_0}{S_0 + K_m} \quad (1.1)$$

a) La concentración molar del complejo [ES] alcanza un pseudo estado estacionario ($\frac{d[ES]}{dt} \approx 0$) en un período de tiempo muy corto ($t_{\text{catálisis}} \rightarrow 0$). Éste es conocido como *Quasi Steady State (QSS)* (Kari et al., 2019).

b) La concentración molar de S_0 es mucho mayor que la misma de E_0 : $E_0 \ll S_0 + K_m$.

Donde v_{ss}^{MM} es la velocidad inicial de reacción en QSS, k_2 es la constante de velocidad catalítica, que representa la tasa de conversión del complejo enzima–sustrato en producto, E_0 y S_0 corresponden a la concentración de enzima y sustrato inicial, respectivamente, y K_m es la constante cinética, constante de Michaelis, indicador de la afinidad enzima–sustrato.

Los parámetros k_2 y K_m pueden ser estimados a partir de experimentos de curvas de progreso (P vs t) evaluando $v_{ss}^{MM} = dP/dt$ para $t_{\text{catálisis}} \rightarrow 0$.

Sin embargo, en el caso de la catálisis enzimática de hueso de salmón suspendido en medio acuoso, es decir un medio heterogéneo, nos encontramos bajo dos importantes cuestionamientos a los supuestos (a) y (b), cuestionamientos que han sido abordados en la literatura, especialmente para la catálisis enzimática del residuo sólido “celulosa”, de gran interés, por cuanto se requiere convertir biomasa en una solución de glucosa (sacarificación) para su posterior uso en la producción de etanol (Kari et al., 2017). Se ha planteado que, debido la naturaleza del sustrato, un sólido polimérico, el QSS no se alcanzaría en tiempo corto ($t_{\text{catálisis}} \rightarrow 0$). En segundo lugar, la concentración molar de sustrato difícilmente es conocida, por cuanto estaría constituida por los sitios de la superficie de la masa de sustrato sobre los cuales se adsorbería la enzima, lo que hace incierto que se cumpla el supuesto (b), $E_0 \ll S_0 + K_m$.

Andersen et al. (2018) propuso un modelo para describir la cinética considerando un sustrato sólido e insoluble (celulósico) denominado modelo de conservación de sustrato (CS), el cual es aplicable en todo el rango de combinaciones de E_0/S_0 . Además, el modelo incorpora un parámetro que estima la relación entre la concentración molar disponible de los sitios de ataque y la carga másica del sustrato, Γ [$\text{mol}_{\text{sustrato}} \text{g}_{\text{sustrato}}^{-1}$], requiriéndose entonces la estimación de tres parámetros cinéticos del modelo: k_2 , K_m , Γ . Así mismo, Kari et al. (2017) y Kari et al. (2019), mostró un procedimiento práctico para la estimación de los parámetros del modelo.

Teniendo en cuenta que el hueso de salmón tiene una estructura similar a la celulosa, es decir, un sólido polimérico, la hipótesis del presente estudio es que la proteína del hueso de salmón

-un sólido insoluble- es un sustrato que se conserva al ser catalizado por enzimas proteolíticas.

El objetivo general de este estudio es evaluar el comportamiento de la cinética en fase heterogénea en medio acuoso de micropartículas de hueso obtenido a partir de esquelón de salmón, estudiando la validez del modelo CS, por medio de la caracterización y el análisis experimental. Para ello, los objetivos que se abordarán de manera específica son:

1. Estimar la concentración molar de la enzima Subtilisina en el preparado enzimático Alcalase 2.5L.
2. Estimar el tiempo al cual se verifica QSS .
3. Dilucidar el protocolo experimental para estimar los parámetros cinéticos del modelo CS (k_2 , K_m , y Γ).
4. Estimar k_2 , K_m , y Γ del modelo CS y verificar su validez.

2 Antecedentes

2.1 Desarrollo sostenible

El desarrollo sostenible se define como aquel que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones para satisfacer sus propias necesidades. En otras palabras, busca equilibrar el crecimiento económico, la inclusión social y la protección del medio ambiente para garantizar un desarrollo armonioso y perdurable a lo largo del tiempo. Las dimensiones del desarrollo sostenible son (Naciones Unidas, 2018):

- **Dimensión Social:** Se refiere a la equidad, la inclusión social, el bienestar de las personas y el respeto a los derechos humanos.
- **Dimensión Económica:** Implica la promoción de un crecimiento económico sostenible, la eficiencia en el uso de recursos y la generación de empleo decente.
- **Dimensión Ambiental:** Se centra en la conservación y protección del medio ambiente, la gestión sostenible de los recursos naturales y la mitigación del cambio climático.

En el contexto de la industria alimentaria, esta se centra en el aprovechamiento de residuos y subproductos alimentarios para la elaboración de nuevos productos o ingredientes puede reducir el desperdicio, aumentar la eficiencia en la cadena de valor, y promover la salud de las personas (Naciones Unidas, 2018).

2.2 Industria del salmón

El salmón (*Salmo salar*) es un pez diadromico de la familia de los salmónidos, que habita en aguas frías, dulces y saladas. Presenta un cuerpo fusiforme cubierto por escamas, una poderosa musculatura y una alimentación basada en crustáceos y otros peces. Su característica más distintiva es el color de su carne, rosa anaranjado, conocido como "color salmón". Puede alcanzar tamaños de hasta 1,5 metros de longitud y 45 kg de peso. Es clasificado como un "pez azul", término que engloba a aquellos peces con un elevado contenido de tejido adiposo, razón por la cual también se les conoce como "peces grasos". Debido a lo anterior, es que el salmón no solo es conocido por el atractivo color de su carne o por su sabor distintivo, sino también por ser una fuente significativa de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, específicamente el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA). Estos ácidos grasos, al ser consumidos, proporcionan beneficios para la salud cardiovascular al reducir los niveles de triglicéridos y colesterol, y al mismo tiempo, tienen propiedades antiinflamatorias (Valenzuela B, 2005). Es una excelente fuente de proteínas de alto valor biológico, así como de minerales como el selenio, fósforo, yodo y potasio. Además, aporta vitaminas del grupo B, como la B6 y B12, niacina, tiamina, vitamina D y E. Su consumo se asocia con beneficios para la protección de las células frente al daño oxidativo, el mantenimiento de huesos y dientes, y el funcionamiento del sistema nervioso (Fundación Española de la Nutrición, s. f.).

Aunque históricamente ha sido considerado un pez de captura salvaje, la actual abundancia del salmón se debe en gran medida a su producción industrializada mediante la acuicultura.

El proceso productivo de la acuicultura del salmón, o salmonicultura, es considerado un proceso cíclico, y por lo tanto, no de extracción (Valenzuela B, 2005). A continuación, se detallan las principales etapas presentes en este proceso (SalmonChile, 2021)

- **Desove, fertilización e incubación:** En otoño se produce el desove de los reproductores. La incubación tiene lugar en agua dulce donde se desarrolla y completa la etapa de eclosión, la cual requiere de aguas limpias y oxigenadas.
- **Alevinaje:** El Alevin nada bajo el cuidado atento y se comienza a alimentar, hasta convertirse en el denominado salmón juvenil.
- **Esmoltificación:** Los salmones juveniles son trasladados al agua de mar por primera vez, donde se vuelven hidrodinámicos y su dorso se torna verde, cambiando también su conducta a la de un cardumen.
- **Engorda:** Alimentación responsable con el medio ambiente hasta llegar al peso de cosecha, alrededor de 4,5 kg.
- **Cosecha:** Los peces son separados por tamaño y enviados a las plantas de proceso.
- **Procesamiento y empaque:** El salmón cosechado es llevado a plantas de procesamiento en donde es eviscerado, se le corta la cola y la cabeza, y el resto del cuerpo constituye la parte comestible. De esta forma, queda disponible para el consumo como filete fresco, filete congelado o ahumado.

2.2.1 Producción mundial de salmón

La producción de salmón a nivel mundial ha ido en aumento en las últimas dos décadas. En la Figura 2-1 es posible notar que tan solo el salmón del Atlántico (*Salmo Salar*) ha logrado triplicar su producción desde el año 2000 hasta el 2020, año en que también logró representar el 32,6% de la producción mundial de peces de acuicultura marina y costera, liderando en el total de especies más importantes producidas en esta categoría (FAO, 2022). El salmón se caracteriza por ser una especie versátil y de alto valor, ideal para la acuicultura a gran escala, ocupando una fuerte posición competitiva en el mercado mundial. El crecimiento de la demanda de salmón ha superado otras categorías de pescado en casi todas las regiones y la acuicultura del salmón del Atlántico ha crecido hasta convertirse en una de las industrias más rentables y tecnológicamente avanzadas.

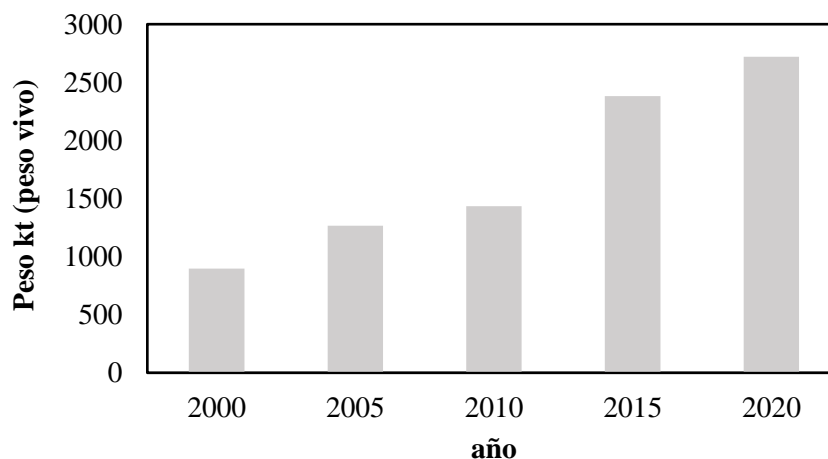


Figura 2-1: Producción mundial promedio, en periodos de 5 años, de salmón atlántico. Datos obtenidos de (FAO, 2022).

En 2020 las exportaciones de salmón ascendieron a 27.600 millones de dólares, liderado por Noruega y Chile. Noruega exporta principalmente a la Unión Europea, mientras que Chile suministra salmón Atlántico en su mayoría a los Estados Unidos, Brasil y Japón (FAO, 2022).

2.2.2 Producción de salmón en Chile

Como se mencionó anteriormente, Chile es el segundo productor mundial de salmón, y de trucha, representando cerca del 33% de la producción global (SalmonChile, 2023). El Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) a diciembre del 2022, reportó que el salmón representó el 50.6 % del total de la acuicultura en términos de cosechas, siendo así un producto significativo en la producción de alimentos, y del sector acuícola en Chile (Departamento de análisis sectorial, 2022). Es así como el salmón se convierte en uno de los alimentos más exportados, junto con la trucha representa alrededor del 7% de las exportaciones nacionales (SalmonChile, 2023). A continuación, en la Tabla 2-1 se presenta por diversas categorías, la participación de exportaciones nacionales de Salmón atlántico, Coho y Trucha durante el periodo de enero-junio del año 2023.

Tabla 2-1: Exportaciones Nacionales en base a varias categorías para Salmón atlántico, Coho y Trucha en el periodo enero-junio 2023 (SalmonChile, 2023).

	WFE (ton)	MMUSD	Variación Interanual USD
Total	497.771	3.317	2%
Por Especie			
Salmon atlántico	342.958	2.474	0%
Coho	126.887	656	21%
Trucha	27.926	187	-17%
Por Mercado			
EEUU	198.018	1.462	-3%
Japón	83.309	457	-12%
Brasil	61.557	433	1%
Otros	59.259	339	6%
A. Latina	32.428	223	2%
Rusia	21.885	144	107%
U. Europea	21.733	115	23%
China	19.582	143	68%
Por Producto			
Filetes	242.117	1.764	4%
Entero	117.606	849	5%
H/G	93.792	457	-3%
Porciones	36.264	206	-3%
Otros	7.992	41	-19%

Por Conservación			
Congelado	28.556	1.723	7%
Fresco	210.688	1.556	-2%
Ahumado	2.052	25	-22%
Otros	1.476	12	-33%

Para el período Enero-Junio de 2023 las exportaciones de salmón atlántico, coho y trucha totalizaron 3.317 millones de dólares. El 69% de las exportaciones correspondieron a salmón atlántico, 25% salmón del pacífico y 6% trucha, en su mayor parte a mercados como Estados Unidos (44%), Japón (14%) y Brasil (13%). El formato más exportado en volumen fue filete fresco de salmón atlántico (25%), seguido de coho congelado H/G (17%), atlántico entero fresco (15%) y filete congelado de atlántico (13%).

2.2.3 Residuos de la industria del salmón

La expansión del procesamiento de la producción pesquera y acuícola ha dado como resultado cantidades cada vez mayores de subproductos, que pueden representar hasta el 70% del pescado procesado (en peso), dependiendo del tamaño, la especie, y el tipo de procesamiento. Es posible evidenciar un promedio de la composición en la mayoría de las especies procesadas por la industria pesquera a continuación en la Tabla 2-2 (FAO, 2022). Los residuos del pescado se denominan comúnmente como subproductos y, si se tratan correctamente, se clasifican como subproductos de categoría 3, ya que podrían ser aptos para el consumo humano (Olsen et al., 2014).

Los subproductos se consideraban tradicionalmente de escaso valor o problemáticos, y se utilizaban como alimento para animales de granja, como fertilizantes, o se descartaban. La mejora en la utilización de subproductos se debe a varias razones, entre ellas las problemáticas medioambientales, económicas, y la necesidad de producir más alimentos para la humanidad a partir de recursos limitados. Los principales subproductos que se obtienen a partir de los residuos de la industria pesquera son la harina de pescado, concentrados de proteína de pescado y aceite de pescado (Olsen et al., 2014).

Tabla 2-2: Valores promedio de diversos residuos en el procesamiento de diversas especies de pescado expresados en porcentaje del peso total del pescado (FAO, 2022).

Subproducto/Residuo	Porcentaje promedio del peso total del pescado %
Cabezas	9–12
Vísceras	12–18
Piel	1–3
Espinas	9–15
Escamas	5

El manejo de subproductos a menudo presenta desafíos significativos tanto desde el punto de vista ambiental como técnico. Esto se debe a la elevada presencia de microorganismos y enzimas en la materia prima, que la hace propensa a descomponerse rápidamente a menos que se procese o almacene adecuadamente. Por lo tanto, es esencial recolectar y tratar los subproductos de manera oportuna para su posterior procesamiento. Se ha prestado mucha atención a transformar esta biomasa en ingredientes funcionales o biológicamente activos (bioactivos) (Olsen et al., 2014). La transformación de estos subproductos pesqueros en nuevos ingredientes o productos en diversas formas ofrece una alternativa valiosa. Esto no solo incrementa el valor de los productos, sino que también ayuda a evitar pérdidas económicas, reduce el impacto ambiental y proporciona a los consumidores opciones de alimentos nutritivos, económicos y convenientes (FAO, 2022).

Los restos de músculos, cabezas, espinazos y algunas partes de las vísceras, como el hígado y las huevas del salmón, son ricos en proteínas y nutrientes esenciales, incluyendo ácidos grasos omega-3, vitaminas A, D y B12, minerales como hierro, zinc, calcio, fósforo y selenio. Estos subproductos pueden ser procesados para crear productos alimenticios altamente nutritivos para el consumo humano, como salchichas, croquetas de pescado, patés, snacks, sopas, salsas, entre otros (FAO, 2022).

Los huesos de pescado también son una valiosa fuente de proteínas, la matriz extracelular de un hueso de pescado se compone de manera similar a la del hueso de mamífero, la cual contiene una fase orgánica constituida en un 90% por colágeno (mayoritariamente del tipo I), y una fase mineral que posee principalmente fosfatos de calcio (CaP) en forma de cristales de hidroxiapatita (HAp) (Li et al., 2020). Estos pueden ser procesados para obtener harina, que se puede utilizar como suplemento alimenticio o como ingrediente fortificante en alimentos como otras harinas, galletas y fideos. Otra opción es procesar los huesos y la piel del pescado para producir gelatina, que puede servir como sustituto de la gelatina convencional (FAO, 2022).

El calcio presente en la espina de pescado representa un alto contenido, en algunos casos se menciona que este se encuentra aproximadamente en una proporción de 234 g/kg de hueso seco, por lo que estudios se basan en obtener el calcio presente en este subproducto de bajo valor como un potencial ingrediente funcional para aplicaciones alimentarias (Li et al., 2020). Por otro lado, el colágeno presente en la espina de pescado, juega un papel fundamental para lograr que el calcio extraído pueda mejorar su bioabsorción como calcio soluble, esto pues al degradarse en péptidos de colágeno y aminoácidos logran quelar los iones de calcio liberados (Ca^{+2}) por la estructura cristalina de HAp, aumentando la solubilidad y estabilidad de los iones de calcio, y evitando que estos formen precipitados en el proceso de digestión en el organismo humano (Li et al., 2020).

2.2.4 Marco legal para la eliminación y aprovechamiento de residuos pesqueros

En Chile, la gestión de residuos en la industria acuícola y pesquera se rige principalmente por las normativas del Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) y por la legislación ambiental vigente. Estas disposiciones establecen que los establecimientos que destinen sus desechos a plantas reductoras deben aplicar procedimientos que aseguren la correcta separación de materiales, evitando la contaminación cruzada y garantizando la

inocuidad de los productos derivados. Asimismo, se exige que la manipulación y transporte de estos residuos cumpla con los estándares sanitarios y de trazabilidad requeridos, considerando las exigencias de los mercados de exportación (Contraloría General de la República, 2020).

A nivel legislativo, la Ley de Fomento al Reciclaje y la Ley de Responsabilidad Extendida del Productor (REP) refuerzan la obligación de los productores y procesadores de gestionar sus residuos de manera responsable, incentivando su valorización como materia prima en nuevos procesos. Estas leyes buscan fomentar el reaprovechamiento de subproductos, aportando a la sostenibilidad económica y ambiental del sector.

2.3 Nutracéuticos y Alimentos Funcionales

Los alimentos o compuestos que promueven la salud generalmente se clasifican en dos grandes categorías: (1) Los alimentos funcionales, son en realidad productos que pueden parecerse o ser un alimento convencional y consumirse como parte de una dieta habitual, pero que además de aportar nutrientes pueden reducir el riesgo de enfermedades. Además de los alimentos tradicionales, también existen alimentos funcionales que se producen mediante el procesamiento de alimentos, como la leche agria antihipertensiva que se ha demostrado que reduce la presión arterial en el organismo humano, por ejemplo (Lagouri, 2019). (2) Los nutracéuticos son componentes naturales de los alimentos u otro producto comestible, que han sido hallados como beneficiosos para el cuerpo humano, previniendo, tratando una o más enfermedades, o mejorando el desempeño fisiológico. Estas sustancias pueden ser: parte del alimento fresco completo, parte de un alimento procesado, una sustancia fortificada o enriquecida en un alimento, o proveerse como suplemento (Estrada-López et al., 2017).

Estudios como el de Malde et al. (2010), han demostrado que el calcio proveniente de huesos de salmón se absorbe de manera eficiente en el organismo humano. La metodología utilizada para la disposición del hueso en la ingesta de los estudios fue disponer el mineral en un tamaño de partícula menor, mediante molienda, no reportado. Otros estudios, como el de Xie et al. (2014), han dado resultados favorables cuando se trata de absorción de calcio dentro del sistema digestivo en ratas Wistar, alimentándolas con hueso de pescado en diferentes tamaños de partícula, mezclado con hidrolizado de proteína de tejido muscular de pescado. Se evidenció que a medida que el tamaño de partícula de hueso era menor (menor o igual a un diámetro de partícula de 74 [µm]), la absorción del calcio en el organismo de las ratas tenía mejores resultados. Por lo que, en definitiva, las espinas del salmón no solo son una potencial fuente natural de calcio debido al alto contenido mineral de la fracción ósea del salmón, sino que también su absorción en el organismo tiene buenos resultados. De esta forma el salmón es un potencial alimento para agregarle funcionalidad.

2.4 Hidrólisis de proteínas

Las proteínas son macromoléculas que se construyen a partir de 20 elementos de construcción, denominados aminoácidos, unidos entre sí mediante enlaces peptídicos para formar polímeros largos no ramificados. Estos polímeros se pliegan formando estructuras tridimensionales precisas que facilitan una enorme variedad de funciones bioquímicas (Stryer et al., 2014). Las propiedades y funciones de un tipo particular de proteína dependen por completo de la secuencia de sus aminoácidos, que es singular en cada proteína, si se cambia un solo aminoácido de la secuencia, puede que la proteína pierda actividad biológica (Coulter, 1998). Las proteínas pueden actuar como moléculas señal, receptoras, estructurales, o como agentes catalizadores, estos últimos se denominan enzimas (Stryer et al., 2014). Un aminoácido se define como una sustancia química orgánica en cuya composición molecular entran un grupo amino y otro carboxilo (como se observa en el lado derecho de la Figura 2-2).

La hidrólisis de proteínas se puede definir como la descomposición química o enzimática de estas macromoléculas en péptidos de diferentes tamaños mediante la acción de agua. A continuación, en la Figura 2-2 se observa el esquema donde se rompe el enlace peptídico mediante la presencia de una molécula de agua, y en su caso inverso, la unión de dos aminoácidos formando un enlace peptídico.

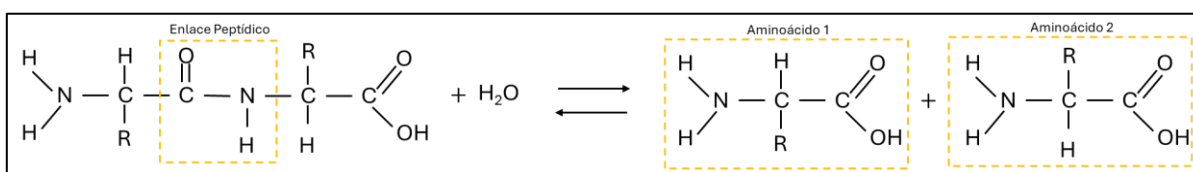


Figura 2-2: Reacción de ruptura / formación del enlace peptídico en una proteína.

Existen diversos factores que pueden afectar a este proceso dada las diferentes propiedades químicas de los enlaces de aminoácidos conjugados, es por eso que se han desarrollado diferentes procedimientos de hidrólisis que varían según el tipo de reacción (química o enzimática), la naturaleza de la reacción química (ácida o básica), y el estado físico de la reacción (líquido o vapor). Los hidrolizados de proteínas se producen para una amplia variedad de usos en la industria alimentaria, y son los métodos químicos los que se utilizan comúnmente, sin embargo, los métodos enzimáticos son los más prometedores pues traen consigo resultados de productos con mayor funcionalidad y valor nutritivo (Kristinsson & Rasco, 2000).

2.4.1 Hidrólisis química

La hidrólisis química de las proteínas se logra rompiendo enlaces peptídicos con ácidos o bases. Para la industria alimentaria es un método económico, pero tiende a ser un proceso difícil de controlar, lo que conduce a productos con composición química y propiedades funcionales variables. La hidrólisis de proteínas en el ámbito alimenticio con solventes químicos y fuertes se realiza a temperaturas y pH extremos, lo que produce productos con cualidades nutricionales reducidas, funcionalidad deficiente y uso restringido como potenciadores de sabor (Kristinsson & Rasco, 2000).

2.4.1.1 Hidrólisis Ácida

La hidrólisis ácida de proteínas es más comúnmente empleada que la hidrólisis básica o alcalina. Se utiliza ampliamente en la preparación de una variedad de productos alimenticios, especialmente aquellos elaborados a partir de fuentes de proteínas vegetales económicas. Aunque su control puede ser desafiante, este proceso es fundamental para la producción de hidrolizados que aportan saborizantes a alimentos como carnes procesadas, galletas saladas y mezclas para sopas (Kristinsson & Rasco, 2000).

En el caso específico de la hidrólisis ácida de proteínas de pescado, generalmente se lleva a cabo mediante la reacción con ácido clorhídrico (o en ocasiones con ácido sulfúrico) a temperaturas y presiones elevadas. Posteriormente, se neutraliza el hidrolizado obtenido a un pH 6.0 – 7.0 y se procede a su secado o concentración. Según Kristinsson & Rasco (2000), la hidrólisis completa del sustrato de proteína de pescado puede lograrse en 18 [h] a 118 [°C] en ácido clorhídrico con una concentración de 6 [N]. Un inconveniente de este proceso es la alta cantidad de sal (NaCl) presente en el producto luego de la neutralización, lo cual puede afectar su funcionalidad y características sensoriales.

2.4.1.2 Hidrólisis básica

Para llevar a cabo esta hidrólisis, se emplean reactivos alcalinos, principalmente el Hidróxido de Sodio (NaOH). Sin embargo, este método no es óptimo para la hidrólisis de proteínas, ya que produce productos con características funcionales deficientes y afecta negativamente su valor nutritivo. A pesar de estas limitaciones, se utiliza comúnmente para recuperar y solubilizar diversas proteínas, como los residuos de pavo deshuesado, que contienen una cantidad significativa de proteínas útiles para la elaboración de productos alimenticios (Kristinsson & Rasco, 2000).

En el caso de la proteína de pescado, se ha experimentado con este método, observando mejoras mínimas en las funcionalidades del hidrolizado en comparación con la proteína original. No obstante, este proceso puede generar reacciones nocivas, como la formación de sustancias tóxicas como la lisinoalanina, que son indeseables en alimentos y otros productos destinados al consumo humano (Kristinsson & Rasco, 2000).

2.4.1.3 Hidrólisis Enzimática

La hidrólisis enzimática de proteínas es un bioproceso que ocurre a temperaturas moderadas, y es importante para mejorar las propiedades físicas, químicas, funcionales y nutricionales de las proteínas originales, sin comprometer su valor nutritivo. También es un método innovador para preparar péptidos activos, que poseen muchas propiedades fisiológicas, que incluyen la unión de minerales, actividad opioide, potenciador del crecimiento de bifidobacterias, regulador de la presión arterial, entre otras (Qi & He, 2006). Las enzimas son catalizadores bioquímicos, estas pueden catalogarse como endógenas, es decir, que se encuentran naturalmente en subproductos alimenticios, o exógenas, lo que implica agregar enzimas de origen externo. La hidrólisis enzimática no ocurre como una sola reacción, sino como una serie de reacciones simultáneas de ruptura de enlaces, lo que hace que el proceso sea complejo. Puede simplificarse en tres etapas consecutivas: primero, la formación del complejo enzima-sustrato; segundo, la ruptura del enlace peptídico liberando un péptido, y

finalmente, el péptido restante sufre un ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua, lo que lo separa de la enzima (Kristinsson & Rasco, 2000).

2.4.2 Hidrolizados enzimáticos de proteínas de pescado

Los hidrolizados de pescado se definen como proteínas de pescado que se descomponen en péptidos de diferentes tamaños. Muchos estudios han dado como resultados hidrolizados de proteínas de pescado con excelentes propiedades funcionales (Kristinsson & Rasco, 2000). Utilizar hidrólisis enzimática para la proteína de pescado proporciona mejor control en el proceso y selectividad para la obtención de un producto con mejores resultados. La hidrólisis enzimática de proteínas de pescado se ha empleado principalmente como un enfoque alternativo para convertir la biomasa de pescado sub-utilizada, que es destinada comúnmente para fabricar piensos o fertilizantes, en productos proteicos comestibles.

Al enfocarse en los residuos del salmón, específicamente en el esquelon de salmón que está compuesto por hueso y músculo adherido, se tiene que este representa aproximadamente un 10% del peso del pescado, cuyo 12% en peso es netamente hueso (Liaset et al., 2003). Investigaciones como la de Liaset et al. (2003) documentaron la composición química de las fracciones producida por hidrólisis enzimática de esquelon de salmón, y evidenciaron que las proteínas del tejido muscular adheridas al hueso se solubilizaron mediante proteasas comerciales (protamex) y representaban el 48% de la proteína cruda total, mientras que la fracción ósea un 11%, con un importante contenido de calcio, fósforo y magnesio. Un balance de masa teórico en una línea de fileteado de salmón podría dar una estimación del rendimiento de calcio. Estos cálculos se basan en investigaciones realizadas sobre la utilización de estructuras de salmón (Liaset et al., 2003; Malde et al., 2010). La Figura 2-3 muestra los números después de operaciones sucesivas.

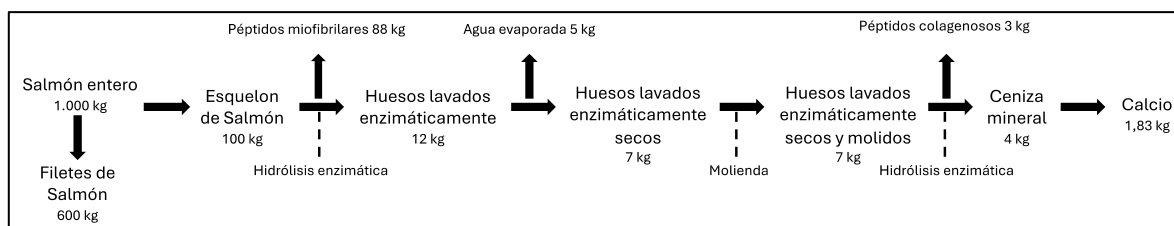


Figura 2-3: Balance teórico de masa en una línea de fileteado de salmón para estimar el rendimiento de calcio que se podría obtener.

Dado que el calcio es el principal subproducto que se desea obtener, es posible observar en el proceso al menos dos instancias en las que se debe hidrolizar proteína de pescado. En particular, esta investigación se basa en el segundo proceso de hidrólisis enzimática, donde la materia prima es hueso de salmón lavado enzimáticamente, secado y molido. En publicaciones como Jung et al. (2006) se ha demostrado que el proceso de hidrólisis de proteína de hueso de pescado ha sido un factor positivo en la absorción de calcio, pues se ha estudiado que el colágeno hidrolizado forma péptidos de colágeno, los cuales pueden quelar el calcio y formar quelatos de calcio, lo cual podría promover la absorción del calcio en el tracto gastrointestinal humano. Estudios como el de Malde et al. (2010) han demostrado resultados favorables en la absorción de calcio en el cuerpo humano, disponiendo el hueso de salmón en un tamaño de partícula menor no reportado, el cual había sido previamente sometido a un proceso de molienda. Por otro lado, el estudio realizado por Li et al. (2020),

simularon la liberación y solubilización de calcio de las espinas de pescado durante el proceso de molienda, demostrando que el contenido de calcio soluble aumentó significativamente, al igual que el contenido de aminoácidos libres y péptidos. Sugieren que la liberación y solubilización del calcio de las espinas de pescado durante la nanomolienda se atribuye a las alteraciones del tamaño y a los efectos quelantes de los aminoácidos y péptidos. Debido a lo anterior es que se desprende la motivación por emplear tanto la reducción de tamaño de la estructura del hueso de salmón, como el proceso enzimático mediante hidrólisis, para la obtención de micropartículas de hueso ricas en calcio altamente biodisponible por el efecto quelante que generan los péptidos de colágeno.

Para llevar este proceso a escalas industriales, es necesario caracterizarlo, controlarlo y optimizarlo primero en escalas de laboratorio. En particular, esta investigación busca caracterizar el proceso de catálisis enzimática de proteína de hueso de salmón (presente en micropartículas de una matriz sólida e insoluble) mediante la acción enzimática de una proteasa Subtilisina contenida en el preparado comercial de nombre Alcalase® 2,5L. De esta forma se podrán controlar condiciones importantes del proceso para la obtención de calcio soluble y péptidos de colágeno, tales como temperatura, pH, tiempo de reacción, concentración inicial de enzima y de sustrato, y concentración de producto formado.

Para poder controlar la concentración inicial de enzima es necesario conocer la concentración molar de la enzima Subtilisina presente en el preparado enzimático Alcalase 2.5L. Para ello es posible emplear una metodología basada en la titulación del sitio activo de la enzima Subtilisina.

2.4.3 Técnica de titulación del sitio activo

Esta técnica se basa en la inactivación parcial de una preparación enzimática con una cantidad conocida de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), un sustrato suicida que inmoviliza el sitio activo de una serina-proteasa (Figura 2-4) como lo es el caso de la Subtilisina, para posteriormente medir la actividad catalítica residual. El procedimiento se debe repetir con cantidades crecientes de inhibidor hasta que se observa la inactivación total y los puntos de datos se representan en una gráfica. La cantidad de PMSF necesaria para la inactivación completa corresponde con el número de sitios activos (en concentración molar) (Van Langen et al., 2002).

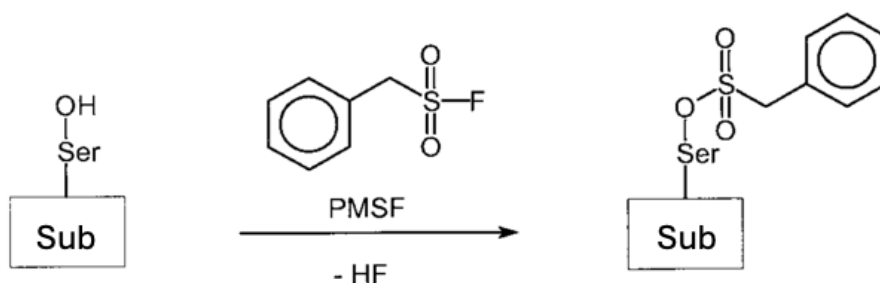


Figura 2-4: Mecanismo de reacción de la Serina (Ser) catalíticamente activa de la Subtilisina (Sub), con una molécula de PMSF, para formar un intermediario acil-enzima estable y sin actividad de Sub.

2.4.4 Procesamiento del esquelón de salmón para la obtención de micropartículas de hueso de salmón con tamaño $d_{50} = 10[\mu\text{m}]$

El aprovechamiento del esquelón de salmón para la producción de micropartículas de hueso implica una secuencia de operaciones destinadas a reducir la dureza del material, eliminar humedad y alcanzar una distribución controlada de tamaño de partícula (Figura 2-5).

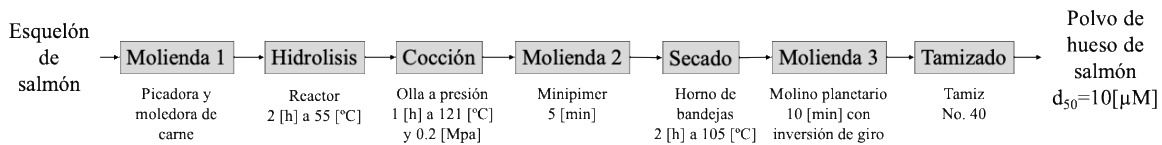


Figura 2-5: Diagrama de flujo de los procesos para la obtención de polvo de hueso de salmón con tamaño de partícula medio de 10 [µm].

Tras la hidrólisis enzimática, el hueso es sometido a una etapa de cocción en condiciones de alta presión y temperatura (~121 °C, 0.2 MPa, durante 1 h), lo que permite ablandar la matriz mineral y facilitar su desintegración (Figura 2-6.2). Posteriormente, el material cocido se separa de la fase líquida y se tritura mecánicamente hasta obtener una pasta homogénea (Figura 2-6.3-4). Esta pasta se distribuye en láminas delgadas y se somete a secado a 105 °C por 2 h, originando hojuelas quebradizas (Figura 2-6.5-7).

El material seco se procesa mediante molienda seca en molino planetario (400 RPM, 2 intervalos de 5 min con inversión de giro, relación medio:producto 4:1, esferas de acero de 10 mm) (Figura 2-6.8). Finalmente, el producto obtenido es tamizado (malla No. 40) para asegurar una fracción de micropartículas con un tamaño medio en torno a $d_{50} = 10[\mu\text{m}]$ (Figura 2-6.9-10).

Este flujo de procesamiento permite transformar un subproducto de la industria salmonera en un polvo fino con propiedades fisicoquímicas controladas, adecuado para aplicaciones funcionales y de valorización.



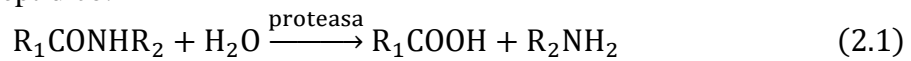
Figura 2-6: Proceso del tratamiento del hueso, posterior a la etapa de hidrolizado. (1) Materia prima (hueso hidrolizado). (2) Cocción de hueso de salmón en olla a presión. (3) Se separa el hueso sólido, del líquido luego de la etapa de cocción. (4) Una vez separado el hueso de la fase líquida se procede a una molienda con minipimer, donde se forma una pasta. (5)

Se dispone la pasta de hueso en una bandeja de estufa. (6) El hueso es secado a 105 [°C] durante 2 horas. (7) Lámina de pasta de hueso luego del proceso de secado, se forman hojuelas. (8) las hojuelas pasan al proceso de micro molienda en molino planetario. (9) El producto de la molienda es tamizado en tamiz No. 40. (10) Hueso de salmón $d_{50}=10$ [μm].

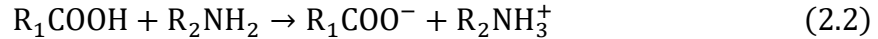
2.4.5 Análisis y caracterización de la hidrólisis enzimática:

Para caracterizar la cinética de la reacción y obtener una medida del grado de degradación hidrolítica es que resulta necesario cuantificar la cantidad de producto formado en el transcurso de la reacción (Kristinsson & Rasco, 2000). Un método adecuado para aquello es medir la cantidad de grupos α – amino libres que se forman producto de la reacción enzimática. El mecanismo de hidrólisis enzimática de sustrato único da lugar a que los productos de la hidrólisis reaccionen intercambiando un protón, como se ve a continuación en las ecuaciones (2.1) y (2.2) (Qi & He, 2006).

Apertura del enlace peptídico:



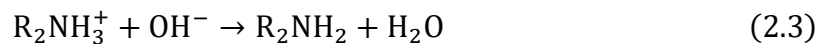
Intercambio de protón:



2.4.5.1 Cuantificación de producto mediante pH-Stat

Debido a este protón liberado en la ecuación (2.2), es que el medio de reacción ve alterado su pH, haciéndose cada vez más ácido según avance la reacción. Es en este punto en donde se utiliza el método de valoración del grupo α – amino protonado, mediante la adición de una base (por lo general NaOH) de forma que se mantenga constante el pH de reacción como se muestra a continuación en la ecuación (.3).

Titulación grupo amino:



Luego, la cantidad de compuesto base consumido es proporcional a la cantidad de grupos α – amino presentes, y por consiguiente, es proporcional a la cantidad de producto formado mediante hidrólisis enzimática (Qi & He, 2006; Valencia et al., 2019). La siguiente ecuación (2.4) permite cuantificar los grupos α – amino producidos mediante variables medibles en el proceso de titulación (P. Valencia et al., 2014).

$$\alpha - \text{NH} [\text{mM}] = \frac{V_{\text{OH}} \cdot N}{\alpha \cdot (V_i + V_{\text{OH}})} \quad (2.4)$$

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad (2.5)$$

$$\text{pK} = 7.8 + \frac{298 - T}{298 T} \cdot 240 \quad (2.6)$$

Donde V_{OH} es el volumen añadido de base, V_i es el volumen inicial de reacción, N representa la normalidad de la base, y α corresponde al grado de disociación promedio de los grupos

α – amino, el cual se calcula a partir de las ecuaciones (2.5) y (2.6), donde se evidencia la dependencia que tiene del pH y temperatura de reacción (T).

Este método implica el uso de un equipo conocido como pH-stato o controlador de pH (ver Figura 2-7), el cual supervisa constantemente el pH de la mezcla de reacción y lo ajusta manteniéndolo constante mediante la adición de NaOH (Kristinsson & Rasco, 2000). El volumen de NaOH agregado se registra en tiempo real. Se trata de un método sencillo y rápido que no requiere la toma de muestras, ya que es continuo y directo. Sin embargo, tiene limitaciones, ya que solo es efectivo para reacciones con pH alcalino a neutro y no es adecuado para aquellas sin control de pH. Además, la adición de compuesto base puede ser indeseable para el producto final, por lo que este método no es aplicable en procesos industriales de alimentos.

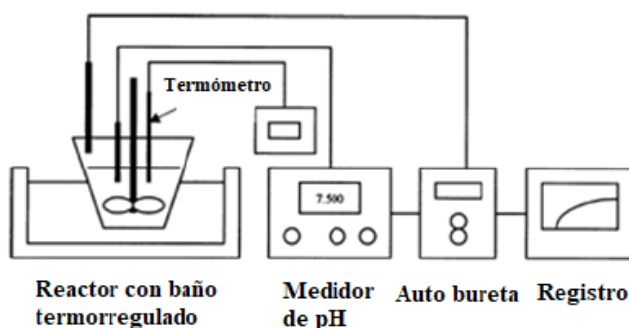


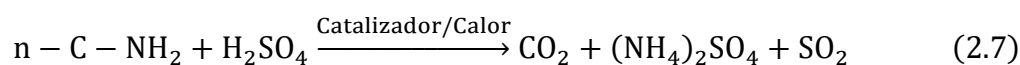
Figura 2-7: Esquema de instalación experimental para el método de valoración con pH-Stato. Obtenido y traducido de (Kristinsson & Rasco, 2000).

2.4.5.2 Cuantificación de proteína (sustrato) presente en la materia prima

El método Kjeldahl es un procedimiento utilizado para analizar el contenido de nitrógeno en una variedad de materiales orgánicos, siendo ampliamente empleado en la determinación del contenido de proteínas en alimentos, fertilizantes, aguas residuales y combustibles fósiles. Este método consta de tres pasos principales: digestión, destilación y titulación (Kjeldahl Method for Determination of Nitrogen, s. f.). Posterior a este proceso se procede al cálculo de proteína con la información recopilada del procedimiento.

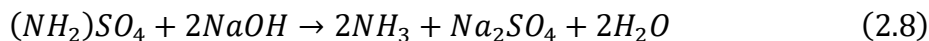
a) Digestión de la muestra:

Durante la digestión, la muestra orgánica se descompone en una solución de ácido sulfúrico concentrado, generando sulfato de amonio (ecuación (2.7)). La adición de una sal inorgánica, como el sulfato de potasio, eleva la temperatura de la solución, acelerando la descomposición orgánica y reduciendo el tiempo de digestión. Sin embargo, es importante controlar la temperatura para evitar la pérdida de compuestos volátiles de nitrógeno.



b) Destilación:

En esta etapa, se añade una base en exceso al producto de la digestión para convertir los iones de amonio en amoníaco gaseoso (ecuación (2.8)), el cual se destila y se condensa en una solución ácida de ácido bórico (ecuación (2.9)). Este proceso permite separar el nitrógeno de la muestra y atraparlo en forma de un complejo de borato de amonio.



c) Titulación:

La cuantificación del nitrógeno amoniacal se realiza por medio de una volumetría ácido-base del ión borato formado (ecuación (2.10)), empleando ácido clorhídrico o sulfúrico, y como indicador, una disolución alcohólica de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno (en caso de valoración colorimétrica). Los equivalentes de ácido consumidos corresponden a los equivalentes de amoníaco destilados.



d) Cálculo:

De la valoración se puede calcular el número de equivalentes de nitrógeno recogidos, y con este dato se obtiene el porcentaje de nitrógeno en la muestra. Para calcular el porcentaje de proteína basta con multiplicar por un factor de conversión el % de nitrógeno calculado. Este factor de conversión está tabulado para cada grupo de alimentos como se muestra a continuación en la Tabla 2-3, donde se recogen factores para algunos alimentos.

Tabla 2-3: Factor de conversión para obtener la tasa de proteína bruta a partir del nitrógeno total (García Martínez & Fernández Segovia, s. f.).

Alimentos	Factor (K)
Harina de trigo	5.70
Trigo, centeno, cebada	5.83
Arroz	5.95
Soja	5.71
Leche y derivados	6.38
Carne y derivados	6.25
Clara de huevo	6.70
Yema de huevo	6.62
Huevo entero	6.68
Gelatina	5.55
Vegetales	6.25

2.4.5.3 Curvas de progreso y velocidad inicial de reacción

Las curvas de progreso son aquellas que representan la cantidad de producto formado, en función del tiempo, para una reacción química. Cada curva es construida teniendo una concentración de enzima y una concentración de sustrato inicial conocida, y se mide la formación de producto a diferentes instantes de tiempo.

La velocidad inicial de reacción se define como la cantidad de producto que se forman por unidad de tiempo poco después de haber comenzado la reacción. Teniendo datos experimentales de formación de producto con respecto al tiempo es posible construir gráficas de progreso y calcular la velocidad inicial de reacción que representa a cada catálisis enzimática, con concentraciones iniciales de sustrato y enzima conocidas. En 2019, Valencia et al. demostró que la constante “a” de la ecuación logarítmica (2.7) corresponde a la velocidad de reacción inicial, ya que como se puede notar en la ecuación (2.8) y (2.9), cuando el tiempo tiende a cero, el límite de esta función es la constante “a”. Esta variable será nombrada posteriormente como v_{ss} , haciendo alusión a la velocidad inicial de reacción en estado estacionario. Para obtenerla se requiere ajustar esta ecuación a datos experimentales para estimar las constantes cinéticas a y b.

$$P = \frac{1}{b} \ln(abt + 1) \quad (2.7)$$

$$\lim_{t \rightarrow 0} P = a \quad (2.8)$$

$$v_{ss} = a \quad (2.9)$$

2.4.6 Modelos de catálisis enzimática

Entre las muchas formulaciones matemáticas de la cinética de sustratos, la cinética de Michaelis-Menten (MM) es usada a menudo porque ha tenido éxito en muchas aplicaciones desde su creación a principios del siglo XX. La cinética de MM es aplicable cuando la concentración de enzima supera con creces la concentración de sustrato, y existe el caso contrario, en donde es el sustrato que supera en creces la concentración de enzima, cuya cinética es modelada por la Reversa de Michaelis-Menten (RMM). Sin embargo, la reacción de hidrólisis enzimática resulta mucho más compleja al considerar factores como: (1) la diversidad de los componentes de la reacción, es decir, los péptidos producidos durante la reacción son productos como también reactantes de la siguiente reacción; (2) multiplicidad de los tipos de reacción: un gran número de enlaces peptídicos son cortados de manera simultánea en paralelo y secuencialmente; (3) complejidad de las redes de reacción, como la existencia de inhibición por sustrato, diversidad de productos e inactivación de enzima durante la hidrólisis; (4) múltiples influencias exógenas como el pH, temperatura, fuerza iónica y la presión sobre la velocidad de reacción (Qi & He, 2006). Considerando además que en los procesos naturales se pueden encontrar situaciones en donde la condición de cantidad de sustrato sobre cantidad de enzimas, o viceversa, puede ir variando, resulta imperativa la búsqueda de modelos cinéticos que pueda funcionar consistentemente en una amplia gama de concentraciones de sustrato y enzima. En el estudio de Tang, (2015) se describe un modelo asociado al *equilibrium chemistry approximation* (ECA), que es aplicable para casi todo el rango de abundancia de sustratos y enzimas. Posterior a esto, y basándose en aquellos estudios, Andersen et al. (2018) propuso un modelo cinético llamado “Modelo de conservación de sustrato”, el cual busca modelar situaciones como la degradación de celulosa (sustrato sólido) mediante enzimas que se encuentran disueltas en un líquido homogéneo. De esta forma el modelo se fomenta en la hipótesis de que cuando una enzima soluble degrada un sustrato insoluble como la celulosa, es probable que ocurra

una condición temporal en la que este es casi constante. Se encontró que las enzimas celulolíticas que trabajan en la interfaz sólido-líquido, muestran una cinética de estado estacionario incluso cuando la superficie accesible del sustrato está cubierta con la enzima (saturación del sustrato). Esta estacionariedad se basa en el equilibrio entre la eliminación enzimática de los sitios de ataque del sustrato que son inicialmente accesibles, y la exposición de nuevos sitios de ataque (originalmente inaccesibles) como resultado de la degradación enzimática.

2.4.6.1 Deducción del modelo de conservación de sustrato

La ecuación de Michaelis–Menten (MM) describe adecuadamente reacciones enzimáticas homogéneas, donde enzima y sustrato son solubles. Sin embargo, cuando la reacción ocurre en la interfase entre un sustrato sólido y una enzima en solución, se trata de un sistema heterogéneo. En este contexto, resulta complejo verificar la aplicabilidad del modelo clásico, pues la concentración molar de sitios accesibles en la superficie (sitios de ataque) suele ser desconocida.

Andersen et al. (2018) propusieron un modelo cinético en el cual la eliminación de sitios de ataque expone de manera simultánea nuevos sitios accesibles, manteniendo constante la fracción de sustrato disponible. De ahí deriva el enfoque denominado modelo de conservación de sustrato.

Para una reacción enzimática simple, se considera el esquema (2.10):



Típicamente, la formación del complejo enzima-sustrato (es) ocurre de manera rápida, seguida de un *Quasi Steady State (QSS)* en el cual $d[ES]/dt \approx 0$. Durante este régimen la velocidad de formación de producto (v_{ss}) se expresa mediante la ecuación de Michaelis-Menten (ecuación (2.11)) para cuando se considera que la concentración inicial de enzima es mucho menor que la concentración inicial de sustrato:

$$v_{ss}^{MM} = \frac{k_2 E_0 S_0}{S_0 + K_m} \quad (2.11)$$

Donde k_2 es la constante de velocidad catalítica, que representa la tasa de conversión del complejo enzima-sustrato en producto, E_0 y S_0 corresponden a la concentración de enzima y sustrato inicial, respectivamente, y K_m es la constante cinética constante de Michaelis, indicador de afinidad enzima-sustrato. Este modelo se asume válido cuando $E_0 \ll S_0 + K_m$. En el caso opuesto, cuando ($S_0 \ll E_0 + K_m$), se aplica el modelo denominado Reversa de Michaelis-Menten (RMM) cuya expresión es:

$$v_{ss}^{RMM} = \frac{k_2 E_0 S_0}{E_0 + K_m} \quad (2.12)$$

Ambas expresiones describen adecuadamente sistemas homogéneos en condiciones de pseudo primer orden. Sin embargo, para sistemas heterogéneos es necesario considerar fenómenos adicionales asociados a la naturaleza del sustrato sólido. Andersen et al. (2018) Estudiaron enzimas celulolíticas sobre interfases líquido-sólido y observaron que, cuando la superficie del sustrato parecía saturada, la cinética mantenía un estado estacionario. Esta estacionariedad se basa en el equilibrio entre la eliminación enzimática de los sitios de ataque del sustrato accesibles, dando lugar a la exposición de nuevos sitios de ataque para la enzima a medida que se va reaccionando, como se puede ver en la Figura 2-8, en donde los espacios accesibles para la enzima se distinguen con color rosa, mientras que aquellos que no pueden ser atacados por la enzima se observan de color naranja. Cuando la enzima logra acoplarse a un sitio activo del sustrato comienza la degradación de las hebras que conforman al sustrato, este proceso se puede observar cuando las hebras color rosa se tornan en un tono más oscuro. Una vez ocurrida la degradación es posible notar que tanto la enzima como la hebra dan lugar a un nuevo sitio activo para que se acople nuevamente otra enzima y logren el complejo enzima-sustrato. Al estar ocurriendo esto de forma simultánea conduce a un supuesto de que existe un número constante de sitios de ataque accesibles para la enzima durante un tiempo limitado.

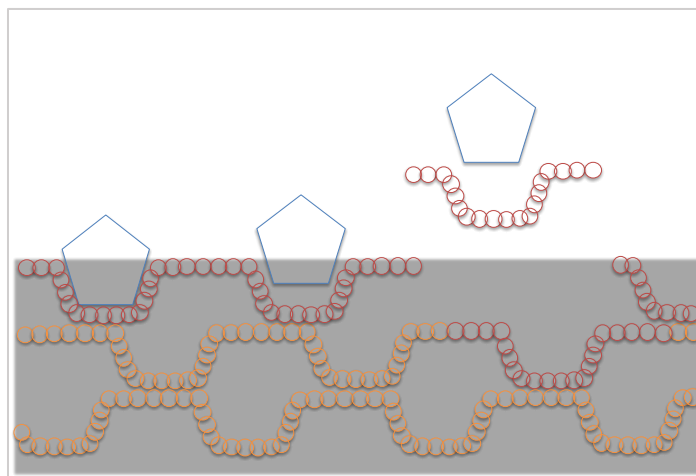


Figura 2-8: Modelo de conservación de sustrato para una enzima degradando un sólido (elaboración propia).

Con este enfoque se puede hablar entonces de que el sustrato es degradado por la enzima, pero a su vez, en términos de sitios activos, sigue existiendo en la reacción de manera constante, lo que da lugar al modelo de conservación de sustrato según el esquema de la ecuación (2.13):



Es importante destacar que el sustrato S representado en el lado derecho del esquema no corresponde al mismo sustrato molecular inicial, sino a la fracción accesible que se va generando conforme progresa la reacción. De este modo, el modelo no describe un proceso autocatalítico ni replicativo, sino un mecanismo en el que el sustrato accesible se conserva de manera efectiva.

A partir de este planteamiento, Andersen et al, 2018 derivaron la expresión cinética del modelo de conservación de sustrato (CS) según la ecuación (2.14):

$$v_{ss} = \frac{1}{2}k_2(S_0 + E_0 + K_m) \left(1 - \sqrt{1 - 4 \frac{S_0 E_0}{(S_0 + E_0 + K_m)^2}} \right) \quad (2.14)$$

Donde v_{ss} representa la velocidad de formación del producto en condiciones iniciales cuando se alcanza QSS.

Esta expresión es particularmente útil para sustratos insolubles ya que la concentración de enzima libre (E_{ss}) puede ser cuantificada experimentalmente mediante separación por centrifugación del sustrato con enzima ligada (ES) y la enzima libre. Luego, a partir de las medidas de v_{ss} y E_{ss} , es posible estimar k_2 como:

$$k_2 = \frac{v_{ss}}{E_0 - E_{ss}} \quad (2.15)$$

Una aproximación lineal del modelo de a ecuación (2.14) conduce a la expresión simplificada (3.16), válida en el rango $\frac{S_0 E_0}{(S_0 + E_0 + K_m)^2} \leq 0.1$:

$$v_{ss}^1 = k_2 \frac{E_0 S_0}{S_0 + E_0 + K_m} \quad (2.16)$$

Finalmente, considerando que para sustratos sólidos la concentración molar se relaciona con la cantidad de moles de sitios accesibles por g de sustrato carga de un sustrato sólido tiene dependencia de los sitios de ataque donde se puede adsorber la enzima, es que la concentración molar del sustrato se expresa según la ecuación (2.17).

$$S_0 = \Gamma \hat{S}_0 \quad (2.17)$$

Donde Γ es la densidad de sitios de ataque en que la enzima puede adsorberse por masa de sustrato [mol/g], y \hat{S}_0 la carga másica de sustrato por volumen de solución [g/L], de esta forma las ecuaciones (2.14) y (2.16) pueden reescribirse como la ecuación (2.18) y (2.19), respectivamente.

$$v_{ss} = \frac{1}{2}k_2(\Gamma \hat{S}_0 + E_0 + K_m) \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4\Gamma \hat{S}_0 E_0}{(\Gamma \hat{S}_0 + E_0 + K_m)^2}} \right) \quad (2.18)$$

$$v_{ss}^1 = k_2 \Gamma \frac{E_0 \hat{S}_0}{\Gamma \hat{S}_0 + E_0 + K_m} \quad (2.19)$$

Este modelo se dedujo sin considerar que existe un exceso de enzima o de sustrato dominando la reacción, dado que el hecho de que se estén generando sitios accesibles de ataque a medida que avanza la reacción puede estar constantemente modificándose esa relación de concentración E_0/S_0 . Una propuesta experimental para obtener los parámetros cinéticos del modelo CS es mediante un análisis combinado de los modelos MM y RMM, ya que al considerar exceso de sustrato al inicio de la reacción ($E_0 \ll S_0 + K_m$) la ecuación (2.19) es análoga al modelo MM considerando que la concentración de sustrato se expresa como la ecuación (2.17). Por consiguiente al considerar un exceso de enzima al inicio de la reacción ($S_0 \ll E_0 + K_m$) la ecuación (2.19) es análoga a RMM bajo el mismo criterio.

- Michaelis-Menten para un sustrato sólido:

$$v_{ss}^{1,MM} = \frac{k_2 E_0 S_0}{S_0 + \frac{K_m}{\Gamma}} \quad (2.20)$$

Donde los parámetros a ajustar en este modelo son k_2 y K_m/Γ .

- Reversa de Michaelis-Menten para un sustrato sólido:

$$v_{ss}^{1,RMM} = \frac{k_2 \Gamma S_0 E_0}{E_0 + K_m} \quad (2.21)$$

Donde los parámetros a ajustar en este modelo son $k_2 \Gamma$ y K_m .

De las ecuaciones (2.20) y (2.21) se puede estimar Γ como:

$$\Gamma = \frac{(K_m)^{RMM}}{\left(\frac{K_m}{\Gamma}\right)^{MM}} \quad (2.22)$$

$$\Gamma = \frac{(k_2 \Gamma)^{RMM}}{(k_2)^{MM}} \quad (2.23)$$

Donde según Kari et al. (2017) los valores de ambas ecuaciones (2.22 y 2.23) diferirán si las suposiciones de exceso de enzima o sustrato no están en lo cierto.

2.4.6.2 Enfoque para el análisis cinético en *Quasy Steady State (QSS)*

Como se ha mencionado antes, en sistemas enzimáticos heterogéneos, como la hidrólisis de celulosa por celulasas, la interacción entre enzima y sustrato ocurre predominantemente en la interfaz del sustrato sólido insoluble. Bajo estas condiciones, además de la unión específica en el sitio activo, pueden intervenir otras fuerzas de interacción superficial que afectan la dinámica del proceso catalítico. Considerando además que existe una modificación gradual de la superficie del sustrato en el progreso de la reacción, se podría explicar que en ensayos de procesos catalíticos enzimáticos sobre esta clase de sustrato se manifiesta una tasa decreciente continua (ver Figura 2-10), incluso cuando factores como la inhibición, la inactivación y el agotamiento del sustrato parecen insignificantes (Kari et al., 2019).

Esta desaceleración, junto con la falta de un tramo claramente lineal en la curva de progreso, representa un desafío para la aplicación directa del supuesto de *QSS*. No obstante, diversos estudios han demostrado que dicho supuesto puede ser válido dentro de intervalos temporales definidos, siempre que se cumpla la condición de equilibrio entre la formación y descomposición del complejo enzima-sustrato (ES). Este equilibrio se alcanza cuando el cambio en la concentración total de sustrato es despreciable durante el intervalo analizado ($dS_0/dt \sim 0$) (Kari et al., 2017).

Una estrategia experimental efectiva para verificar esta condición consiste en cuantificar la concentración de enzima libre a lo largo del tiempo. Si dicha concentración permanece constante, como se observa en la Figura 2-9 luego de 2-3 minutos, puede asumirse que tanto la adsorción como la actividad han alcanzado un régimen pseudo-estacionario. Este enfoque fue incorporado en el presente trabajo: además de las curvas de progreso para la obtención de las velocidades iniciales de reacción en *QSS*, se mide la fracción de enzima libre durante la reacción a una concentración de enzima y sustrato específica. Además, mediante esta metodología se puede estimar k_2 como se mencionó anteriormente según la ecuación (2.15).

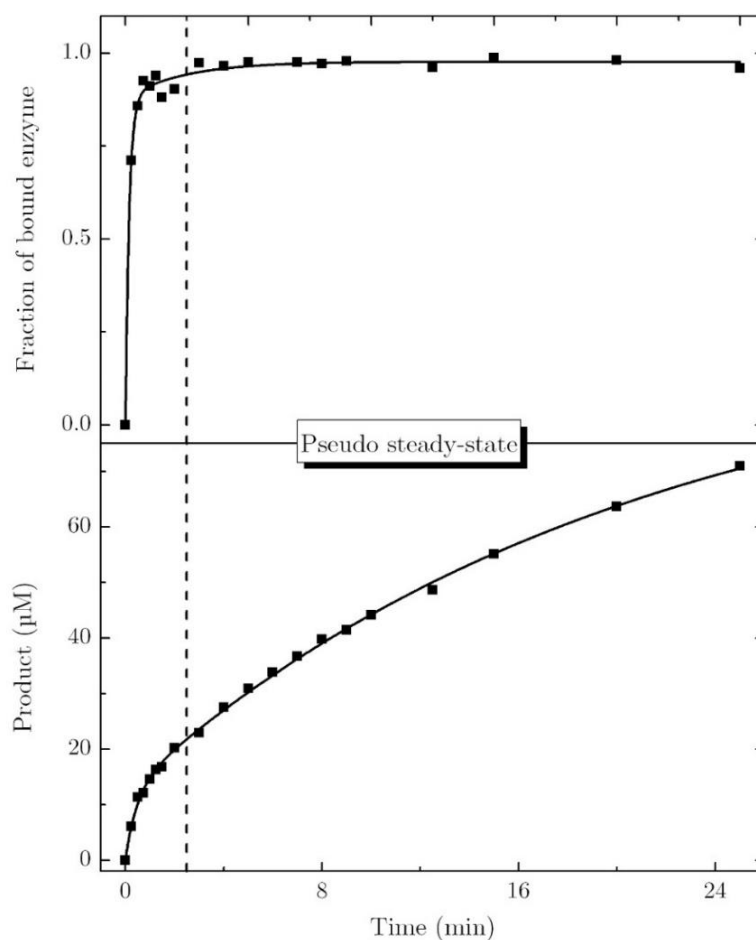


Figura 2-9: Fracción de enzima H_jCel7A adsorbida sobre Avicel (parte superior) y concentración de producto formado (parte inferior) en función del tiempo, a una concentración enzimática de 500 nM y carga de sustrato de 50 g/L. Las líneas sólidas fueron añadidas para guiar la visualización de los datos experimentales (Kari et al., 2017).

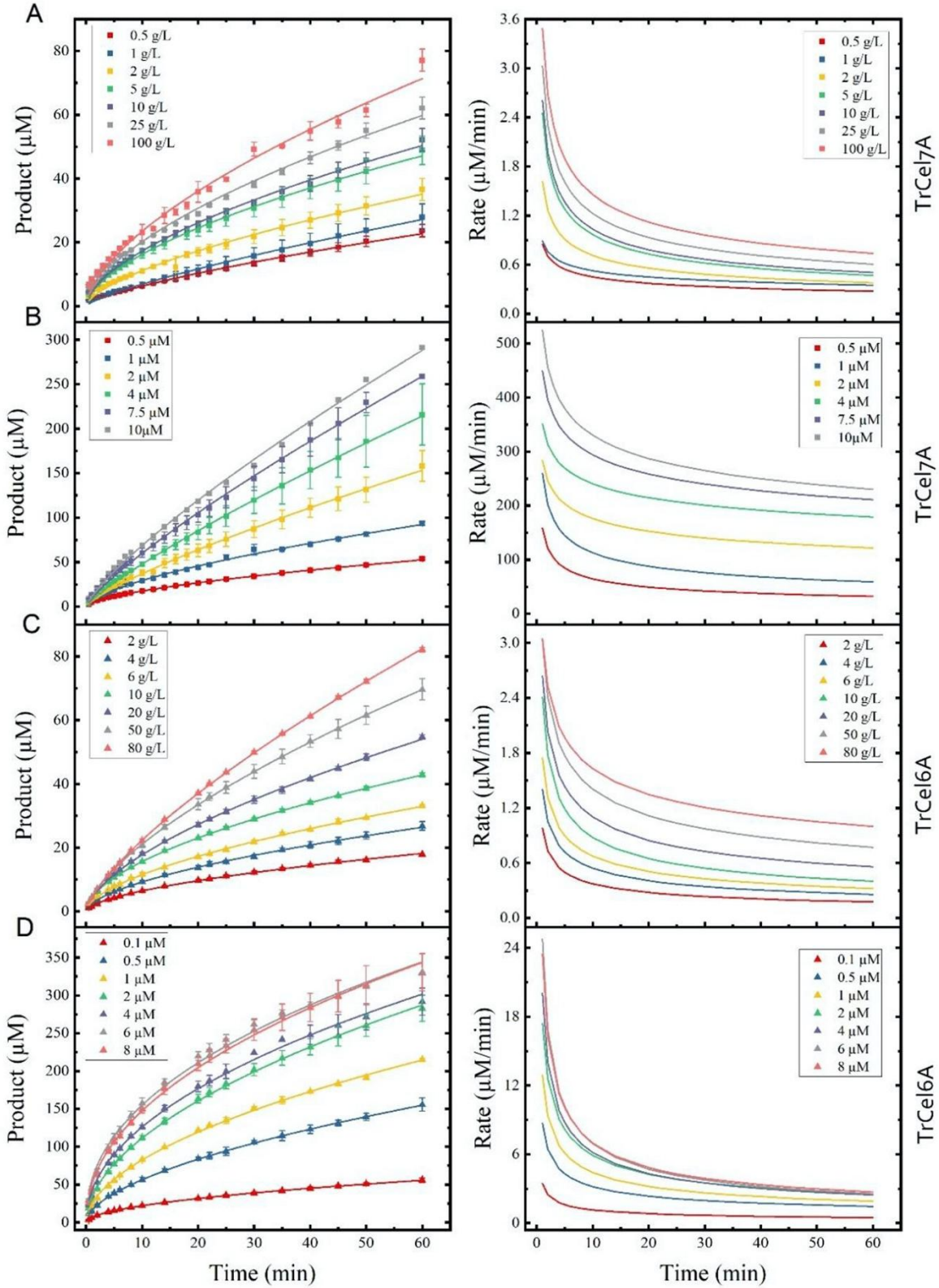


Figura 2-10: Curvas de progreso y tasas derivadas para dos celulasas (TrCel7A y TrCel6A) actuando sobre celulosa microcristalina (Avicel) a 25 °C. Los paneles ilustran experimentos bajo condiciones de saturación de sustrato (paneles A y C) y saturación de enzima (paneles B y D), obtenidos al variar la carga de sustrato o la concentración enzimática respectivamente. Para el análisis de tasas, los autores utilizaron un ajuste tipo $P(t)=At^B$, cuya derivada proporciona una estimación continua de la velocidad de reacción dp/dt (Kari et al., 2019).

3 Materiales y métodos

3.1 Metodología y diseño experimental

Para desarrollar los objetivos específicos de este estudio se muestra en la Figura 3-1 un esquema que detalla cada uno de ellos (“¿Qué?”), la manera de cómo abordarlos (“¿Cómo?”), y lo que se obtiene de cada etapa (“¿Para qué?”).

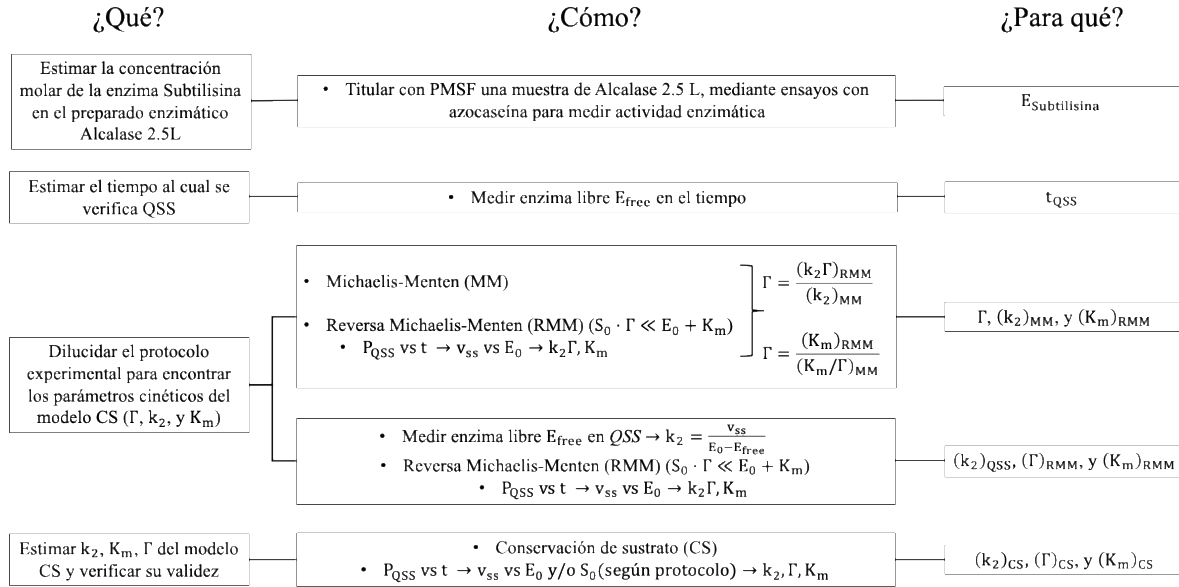


Figura 3-1: Esquema de metodología para abordar cada objetivo específico de la investigación.

En la Figura 3-1 se observa que existen dos caminos para cumplir con el objetivo que busca dilucidar el protocolo para encontrar los parámetros cinéticos del modelo CS. Uno de ellos es por medio del ajuste de los modelos de MM y RMM a datos experimentales que cumplan sus dominios de validez, y de forma combinada se obtengan los parámetros cinéticos. Sin embargo, tal y como se mencionó en otras investigaciones, es posible que para este tipo de reacciones interfaciales el enfoque de MM no entregue información relevante debido a que su aplicabilidad se limita a concentraciones extremadamente bajas de concentración de enzima para este tipo de sustratos, lo que dificulta su desarrollo experimental. Es por ello que se sugiere una segunda metodología basada en experimentación con el enfoque de RMM, ya que se ha verificado que es útil para procesos enzimáticos interfaciales debido a que es válido en condiciones experimentales fáciles de lograr para este tipo de sustratos. Este enfoque se complementa con que a partir de los experimentos de medición de enzima libre en QSS es posible estimar la constante cinética k_2 , y por lo tanto se puede obtener Γ al ajustar RMM considerando ese valor para k_2 . En consecuencia, se ajustará el modelo CS y verificará su validez una vez se establezca el protocolo experimental adecuado para la experimentación con proteína de hueso de salmón.

Se emplearon micropartículas de hueso de salmón ($d_{50} = 10[\mu\text{m}]$) y se consideró como sustrato la proteína contenida por unidad de masa de hueso medida por método Kjeldahl ($0.21 \text{ g}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{hueso}}$). Se utilizó Alcalase 2.5L como fuente de enzima Subtilisina. El hueso de salmón proviene del esquelón de salmón proporcionado por la empresa FiordoAustral.

Tabla 3-1: Variables para cada procedimiento experimental.

Categoría	Variable/Parámetro	Descripción/Niveles
Determinación de concentración molar de Subtilina en Alcalase 2.5L		
Variable dependiente	- Actividad catalítica residual de la Subtilisina	- Estimada mediante ensayo con azocaseína
Variables independientes	- Concentración molar PMSF - Relación volumen PMSF:Enzima	[$5.92 \times 10^2 - 1.07 \times 10^{-1}$] [mM] - 0.1/1.4 mL/mL PMSF:Alcalase2.5L
Parámetros/Condiciones controlados/as	- Temperatura de reacción - Tiempo de incubación antes de medir actividad - Preparado enzimático empleado	- 50 [°C] - 10 [min] - Alcalase 2.5L
Estimación de tiempo inicial de QSS		
Variable dependiente	- Concentración de enzima libre [E_{free}] - Concentración de producto formado en el tiempo P(t)	- Estimada mediante ensayo con azocaseína - Estimado mediante valoración con pH-Stat
Variables independientes	- Concentración inicial de Enzima [E_0] - Concentración inicial de Sustrato [S_0]	- 3.82 [μ M] (Subtilisina) - 30.0 [g L ⁻¹] (proteína)
Parámetros/Condiciones controlados/as	- Tiempo de toma de muestras (deteniendo la reacción en frío) - Tiempo total de reacción - Agitación - pH - Concentración NaOH - Temperatura de reacción - Tipo de sustrato sólido - Método de separación	- 5, 30, 60, 90, 180, 360, 480, 600, 900, 1200 [s] - 1200 [s] - 50 % - 7.5 - 1.5 [N] - 50 [°C] - Mismo lote - Centrifugación
Estimación de parámetros cinéticos MM: k_2 y K_m/Γ		
Variable dependiente	- Concentración de producto formado en el tiempo P(t) - Velocidad inicial de reacción a condiciones de QSS (v_{SS})	- Estimado mediante valoración con pH-Stat - Estimado mediante ajuste de P(t) a ec. (3.7)
Variables independientes	- Concentración inicial de Sustrato [S_0]	7.5; 14; 23; 30; 45 [g L ⁻¹]
Parámetros/Condiciones controlados/as	- Tiempo total de reacción - Agitación - pH - Concentración NaOH - Temperatura de reacción - Tipo de sustrato sólido	- 1200 [s] - 50 % - 7.5 - 1.5 [N] - 50 [°C] - Mismo lote
Estimación de parámetros cinéticos RMM: $k_2\Gamma$ y K_m		

Variable dependiente	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración de producto formado en el tiempo P(t) - Velocidad inicial de reacción a condiciones de QSS (v_{ss}) 	<ul style="list-style-type: none"> - Estimado mediante valoración con pH-Stat - Estimado mediante ajuste de P(t) a ec. (3.7)
Variables independientes	<ul style="list-style-type: none"> - Concentración inicial de Enzima [E_0] 	<ul style="list-style-type: none"> 7.63x10⁻¹; 3.82; 7.63; 1.91x10¹; 3.82x10¹; 7.63x10¹; 1.14x10² [μM]
Parámetros/Condiciones controlados/as	<ul style="list-style-type: none"> - Tiempo total de reacción - Agitación - pH - Concentración NaOH - Temperatura de reacción - Tipo de sustrato sólido 	<ul style="list-style-type: none"> - 1200 [s] - 50 % - 7.5 - 1.5 [N] - 50 [°C] - Mismo lote

3.1.1 Consideraciones preliminares para experimentos con hueso de salmón $d_{50} = 10$ [μ m].

La concentración inicial de sustrato S_0 (proteína de hueso de salmón) se varía en cada experimento. La concentración máxima de hueso empleada es del 15 % (m/m) debido a que en rangos superiores la mezcla hueso-agua tiende a aglomerarse. En la Figura 3-2 se observa como la mezcla hueso-agua forma una matriz semisólida plástica y moldeable, cuando está a una concentración de 50 % (m/m).



Figura 3-2: Matriz semisólida, plástica, y moldeable, con 50% p/p de hueso $d_{50} = 10$ [μ m] en una mezcla hueso-agua.

3.2 Métodos

3.2.1 Titulación del sitios activos en Alcalase 2.5L (Subtilisina)

1. Materias primas y reactivos:

- Azocaseína
- Solución tampón sodio fosfato 50 [mM] pH 7.5
- Ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v)
- NaOH 1[N]
- PMSF
- Etanol absoluto

- Alcalase 2.5L
- Agua desionizada

2. Equipos:

- Baño térmico seco
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica

3. Procedimiento experimental:

Preparación Azocaseína 1.0% (m/v)

1. Pesar 1.00 [g] de azocaseína en balanza analítica.
2. Disolver la azocaseína en 100 [mL] de solución tampón sodio fosfato (50 [mM], pH 7.5) con agitación y calefacción a 50 [°C].
3. Dividir en porciones (se recomienda en tubos falcon de 50 [mL]) y almacenar congelado en caso de no usarse inmediatamente.

Preparación de PMSF

1. Pesar 0.1 [g] de PMSF y diluir en 10 [mL] con etanol absoluto. Rotular esta dilución como C_1 .
2. Diluir C_1 10 veces. Se recomienda que la dilución sea tomando 1.0 [mL] de C_1 y aforar en 100 [mL] con etanol absoluto. Rotular esta dilución como C_2 .
3. Diluir C_2 10 veces. Se recomienda que la dilución sea tomando 1.0 [mL] de C_2 y aforar en 100 [mL] con etanol absoluto. Rotular esta dilución como C_3 .
4. Diluir C_3 en razones de 1:10, 3:10, 4:10, 6:10, 8:10, en tubo endorf de 1.5 [mL], para esto se suponen volúmenes aditivos, y se mezcla la cantidad necesaria de volumen de C_3 + volumen de etanol absoluto para cumplir con las diluciones en un total de 1 [mL] (ver Figura 3-3). Rotular diluciones como C_{31} , C_{32} , C_{33} , C_{34} , C_{35} , respectivamente.

Preparación muestra de solución de proteasa para titulación de sitios activo: Para cada muestra agregar en un tubo endorf de 1.5 [mL], 0.1 [mL] de PMSF de dilución C_{3i} ($i\{1,2,3,4,5\}$), y 1,4 [mL] de Alcalase 2.5L diluida 1:935 (ver Figura 3-3).

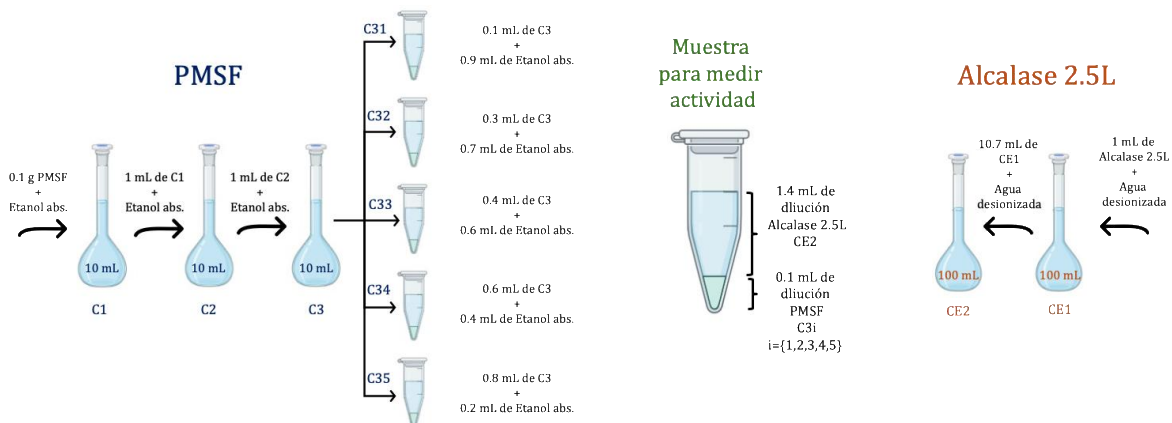


Figura 3-3: Preparación de muestras para curva de titulación de Subtilisina con PMSF.

Titulación de sitios activos mediante ensayo de actividad

1. Para crear muestras de proteasa con el agente inmovilizante de serina (PMSF), agregar en un tubo eppendorf de 1.5 [mL], 0.1 [mL] de PMSF de dilución C_{3i} ($i\{1,2,3,4,5\}$), y 1,4 [mL] de Alcalase 2.5L diluida 1:935 (ver Figura 3-3).
2. En el baño seco a 50 [°C] incubar 1.0 [mL] de azocaseína 1.0% (m/v) en tubo eppendorf de 2 [mL].
3. Añadir 100 [mL] de solución de proteasa-PMSF, y agitar en vortex.
4. Volver al baño seco e incubar por 10 minutos.
5. Detener reacción agregando 1.0 [mL] de TCA 10%, agitar en vortex.
6. Para el blanco incubar 1.0 [mL] de azocaseína 1.0% (m/v) por 10 minutos. Agregar 1.0 [mL] de TCA 10% (v/v), y luego añadir los 100 [μL] de solución de proteasa-PMSF.
7. Separar fases centrifugando a 8000 RCF por 6 minutos.
8. Mezclar 1.0 [mL] de sobrenadante con 1.0 [mL] de NaOH 1[N].
9. Medir absorbancia a 440 [nm]
10. Hacer ensayo en duplicado o triplicado.

Consideraciones para el ensayo

- Obtener curva de actividad proteolítica vs concentración de PMSF.
- Se realizan ensayos preliminares [U/mL] para determinar las concentraciones de PMSF [mM] a utilizar de forma que se obtenga la parte lineal de la curva, y además, que se obtenga un absorbancia medible a 440 [nm] entre 0,999 y 0,100.

Unidad actividad proteolítica [U/g]

Se define la unidad de Actividad proteolítica U/g como la cantidad de preparado enzimática (en gramos) que es responsable de producir un cambio en 1,0 unidad de absorbancia medida a 440 nm en cubeta de 1 [cm], por minuto de reacción bajo las condiciones del ensayo con azocaseína descritas en el procedimiento (azocaseína 1% (m/v), pH 7,5, 50°C por 10 min). Desde ahora en adelante la unidad U/g se referirá únicamente a la actividad proteolítica obtenida del ensayo con azocaseína descrito.

Teniendo en cuenta esta definición, el valor de la actividad proteolítica en las unidades [U/g] se obtendrá determinando la pendiente de la recta Absorbancia vs Cantidad de enzima (en gramos) y dividiéndola por los 10 minutos de reacción. Esto siempre verificando la linealidad de la recta obtenida.

3.2.2 Hidrólisis enzimática

1. Materias primas y reactivos:

- Alcalase 2.5L
- Hueso de salmón $d_{50} = 10$ [μm]
- Agua desionizada
- NaOH 1.5 [N]

2. Equipos:

- Balanza analítica
- Baño termostático
- Valorador compacto Mettler-Toledo G20
- Refrigerador



Figura 3-4: Montaje experimental para llevar a cabo las hidrólisis enzimáticas y la valoración de grupos α -NH₃ mediante pH-stato, utilizando baño termostático y el equipo Mettler-Toledo G20.

3. Procedimiento experimental:

Antes de hidrolizar:

- Verificar nivel de agua (desionizada) en el baño termostático, encender y fijar la temperatura de trabajo (52 [°C])
- Preparar enzima (diluir) y almacenar refrigerada
- Encender equipo valorador compacto G20, calibrar el electrodo y lavar la bureta con la solución tituladora (NaOH 1.5 [N])
- Preparar mezcla hueso-agua en un vaso de reacción (reactor)

Hidrólisis:

1. Introducir reactor en el baño termostático. Introducir electrodo y termocupla (Figura 3-4), y comenzar a agitar con velocidad en 50%.
2. Una vez la mezcla haya alcanzado la temperatura de trabajo (~50 – 52 [°C]), ajustar el pH de la mezcla de reacción a 7.5 usando la dosificación autónoma de NaOH (1.5 [N]) del equipo valorador, considerando un programa que ajuste el pH al que se desea trabajar durante 10 a 20 minutos. Cabe señalar que se emplea NaOH para el ajuste de pH debido a que la mezcla de hueso-agua es ácida (pH~5.0).
3. Seleccionar el programa de valoración a pH 7.5 durante 10 minutos, con agitación al 50%. Una vez el equipo comience a medir esperar 20 segundos para que el pH de reacción sea estable (~7.5), y añadir 100 [μL] de enzima. El equipo llevará registro

del volumen dosificado de solución tituladora en el tiempo, así como también del pH y la temperatura. Llevar registro de los segundos exactos que se esperó para añadir la enzima una vez el equipo comenzó a medir, ya que estos deben ser considerados al momento de tratar los datos.

4. Al finalizar el tiempo de reacción que se desea medir (10 minutos), retirar el vaso de reacción del equipo, lavar con agua desionizada el electrodo, la termocupla y el agitador. Para este estudio se descarta el contenido del reactor en el desagüe.
5. Almacenar los datos en una planilla Excel señalando la concentración inicial de enzima y hueso empleada.

3.2.3 Estimación de tiempo inicial de *QSS*

Para cuantificar la formación del complejo-enzima sustrato se mide la actividad de la enzima presente en la fase soluble (enzima libre), a diferentes instantes de la reacción. Dado que la actividad inicial en la reacción está asociada a la concentración inicial de enzima en el experimento, se considera que la actividad residual entre la actividad inicial y la actividad de la fase soluble corresponde a la concentración del complejo enzima-sustrato.

1. Materias primas y reactivos:

- Azocaseína
- Solución tampón sodio fosfato 50 [mM] pH 7.5
- Ácido tricloroacético (TCA) 10% (v/v)
- NaOH 1[N]
- Etanol absoluto
- Alcalase 2.5L (1:50)
- Hueso de salmón $d_{50} = 10$ [μm] (8.0 [g])
- Agua desionizada
- NaOH 1.5 [N]

2. Equipos:

- Baño térmico seco
- Espectrofotómetro
- Balanza analítica
- Baño termorregulado
- Valorador compacto Mettler-Toledo G20
- Refrigerador
- Congelador

- Procedimiento experimental:

Antes de hidrolizar:

- Almacenar en el congelador los tubos ependorf que se emplearan para la extracción de muestras de la reacción de hidrólisis en diferentes instantes.
- Verificar nivel de agua (desionizada) en el baño termorregulado, encender y fijar la temperatura de trabajo (52 [°C])
- Preparar enzima (diluir) y almacenar refrigerada
- Encender equipo valorador compacto G20, calibrar el electrodo y lavar la bureta con la solución tituladora (NaOH 1.5 [N])

- Preparar mezcla hueso-agua en un vaso de reacción (reactor)

Hidrólisis:

1. Introducir reactor en el baño termostático. Introducir electrodo y termocupla, y comenzar a agitar con velocidad en 50%.
2. Una vez la mezcla haya alcanzado la temperatura de trabajo ($\sim 50 - 52$ [°C]), ajustar el pH de la mezcla de reacción a 7.5 usando la dosificación autónoma de NaOH (1.5 [N]) del equipo valorador, considerando un programa que ajuste el pH al que se desea trabajar durante 10 a 20 minutos. Cabe señalar que se emplea NaOH para el ajuste de pH debido a que la mezcla de hueso-agua es ácida (pH \sim 5.0).
3. Seleccionar el programa de valoración a pH 7.5 durante 20 minutos, con agitación al 50%. Una vez el equipo comience a medir esperar 20 segundos para que el pH de reacción sea estable (~ 7.5), y añadir 100 [μL] de enzima. El equipo llevará registro del volumen dosificado de solución tituladora en el tiempo, así como también del pH y la temperatura. Llevar registro de los segundos exactos que se esperó para añadir la enzima una vez el equipo comenzó a medir, ya que estos deben ser considerados al momento de tratar los datos.
4. Una vez añadida la enzima, extraer muestras de 0.5 [mL] a diferentes instantes de la reacción, y depositarlas en los tubos eppendorf previamente enfriados y reservar en frío.
5. Al finalizar el tiempo de reacción que se desea medir (20 minutos), retirar el vaso de reacción del equipo, lavar con agua desionizada el electrodo, la termocupla y el agitador. Para este estudio se descarta el contenido del reactor en el desagüe.
6. Almacenar los datos en una planilla Excel señalando la concentración inicial de enzima y hueso empleada.
7. Centrifugar las muestras de reacción durante 6 minutos a 8000 RCF. Extraer la fase de cada muestra en tubos eppendorf previamente rotulados según el instante de tiempo en el que se extrajo cada una.
8. Reservar muestras para ensayo de actividad con azocaseína.

Ensayo con azocaseína para medir actividad proteolítica

1. En el baño seco a 50 [°C] incubar 1.0 [mL] de azocaseína 1.0% (m/v) en tubo eppendorf de 2 [mL].
2. Añadir 100 [mL] de solución de muestra de reacción, y agitar en vortex.
3. Volver al baño seco e incubar por 10 minutos.
4. Detener reacción agregando 1.0 [mL] de TCA 10%, agitar en vortex.
5. Para el blanco incubar 1.0 [mL] de azocaseína 1.0% (m/v) por 10 minutos. Agregar 1.0 [mL] de TCA 10% (v/v), y luego añadir los 100 [μL] de muestra de reacción.
6. Separar fases centrifugando a 8000 RCF por 6 minutos.
7. Mezclar 1.0 [mL] de sobrenadante con 1.0 [mL] de NaOH 1[N].
8. Medir absorbancia a 440 [nm]
9. Hacer ensayo en duplicado o triplicado.

3.2.4 Estimación de tiempo inicial de QSS mediante filtro de suavizado y diferenciación de Savitzky-Golay (savgol)

El filtro de suavizado y diferenciación Savitzky-Golay se utiliza a menudo para suavizar datos ruidosos (por ejemplo curvas experimentales) sin perder las características importantes, como los picos o las tendencias locales. Este filtro permite reducir el ruido de alta frecuencia en una señal gracias a sus propiedades de suavizado, así como las señales de baja frecuencia (p. ej., debido a desplazamientos y pendientes) mediante la diferenciación.

El filtro consiste en que para una determinada señal medida en N puntos, y un ancho de filtro “ w ”, savgol ajusta un polinomio de orden “ o ” mediante mínimos cuadrados, en cada ventana de filtro a medida que el filtro se mueve a través de la señal, y reemplaza el punto central por el valor del polinomio. El ancho de ventana del filtro “ w ” es típicamente un valor impar, y a medida que este valor es más grande, implica que la curva es más suavizada pero disminuye el detalle de la curva (ver Figura 3-5). En cuanto al orden del polinomio “ o ”, grados más altos permiten seguir mejor curvas con cambios rápidos, pero también pueden introducir oscilaciones indeseadas. Una restricción para el filtro es que $w \geq (o + 1)$, es decir, el número de mediciones debe ser \geq al número de parámetros a estimar. Si $w > (o + 1)$ entonces el filtro suaviza la señal, y si $w = (o + 1)$ no se proporciona suavizado (Gallagher, s. f.).

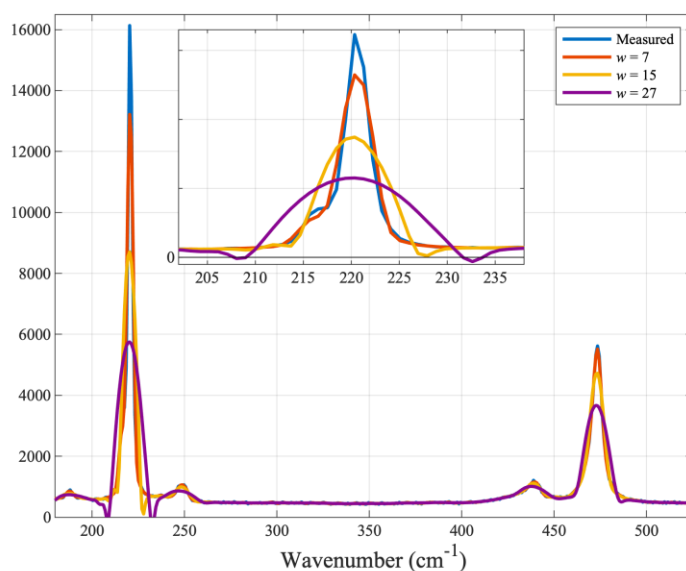


Figura 3-5: Espectro de medido (azul) y datos suavizados de savgol con ancho de filtro $w=\{7,15,27\}$, y oren polinomial $o=2$ (Gallagher, s. f.).

Dado que ya se tiene un polinomio ajustado, se puede derivar analíticamente. Al aplicar la primera derivada se logran resaltar cambios bruscos en la señal (pendientes), mientras que al aplicar la segunda derivada se resalta la curvatura de la señal (donde empiezan y terminan los picos). Esto permite suprimir las variaciones lentas, es decir, las señales de baja frecuencia como desplazamientos de base, inclinaciones del fondo o tendencias lineales que no son de interés. Lo que sobrevive son los cambios más rápidos en la señal, que suelen corresponder a la información real: aparición de un pico, un cambio en la velocidad de reacción, un umbral fisiológico.

En el presente trabajo, el filtro de Savitzky-Golay se utilizó con el propósito específico de estimar el tiempo inicial de establecimiento del régimen de QSS en las curvas de progreso de reacción.

-Procedimiento y criterio de QSS (MATLAB)

Las curvas de progreso $P(t)$ serán suavizadas y derivadas mediante un filtro de Savitzky-Golay (orden 2-3; ventana temporal de 90-120 [s]) con el fin de estimar la velocidad instantánea de formación de producto $\dot{P}(t)$. El inicio del régimen de QSS (t_{QSS}) se determinará como el primer instante en que la pendiente local $\dot{P}(t)$, estimada por regresión lineal en una ventana temporal deslizante, permanece por debajo de un umbral definido $\epsilon = k \text{MAD}(\dot{P})$, mediante la desviación absoluta mediana $\text{MAD}(x) = (\text{mediana}(|x - \text{mediana}(x)|))$, con $k = 3$. Durante al menos 25 puntos consecutivos. Además, se exigió un coeficiente de variación menor a 0.08 dentro de una ventana de validación.

A partir t_{QSS} , la formación de producto se redefinió como $P^*(t) = P(t) - P(t_{QSS})$, $t \geq t_{QSS}$ lo que implica que $P^*(t_{QSS}) = 0$. Luego, los datos experimentales de las curvas de progreso $P^*(t)$ se ajustaron a la ecuación logarítmica de formación de producto (ecuación (3.7)) y a partir del parámetros “a” se obtuvo la velocidad inicial en QSS “ v_{ss} ”, junto con su IC del 95% de certeza obtenido de la matriz jacobiana del ajuste.

3.2.5 Herramientas de cálculo y análisis de regresión

Para esta investigación se ha requerido calcular los parámetros de dos principales ecuaciones no lineales mediante ajustes de regresión, los cuales resultan significativos para el análisis de los resultados. A continuación, se detalla la metodología empleada para calcular los parámetros y el posterior análisis de dicho ajuste.

- a) Cálculo de parámetros mediante regresión no lineal: minimización del error cuadrático (SC_E)

Se define como residuo a la diferencia entre lo observado (y_i) y lo estimado o predicho (\hat{y}_i), y es también una estimación del error e_i según la ecuación (3.5) (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad (3.5)$$

Luego, es claro observar que, si el valor estimado es considerablemente distinto al valor observado, este error crecerá en magnitud, por lo que se dice que el modelo no estaría representando bien a los datos experimentales. Es por ello que para cuando los parámetros del modelo son una incógnita y se desea obtenerlos mediante experimentos, se puede recurrir a herramientas computacionales que busquen minimizar este error al ir iterando los parámetros desconocidos. Dado que al momento de minimizar una función se puede considerar que esta pueda aumentar en magnitud, pero negativamente, es que la ecuación (3.5) se eleva al cuadrado, de esta forma su recorrido siempre será mayor a cero, y al minimizarla, su objetivo será encontrar aquellos valores de los parámetros que permitan que esta tienda a cero. Por otro lado, como cada dato observado tendrá un error asociado a su predicción, es que para que el modelo ajuste a todos los datos simultáneamente se calcula lo

que se conoce como “suma de cuadrados del error”, que está dada por la ecuación (3.6)(Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

$$SC_E = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (3.6)$$

Mediante la herramienta Solver de Excel es posible calcular los parámetros de un modelo, minimizando la ecuación (3.6).

b) Análisis de calidad del ajuste

Para evaluar si la regresión efectuada en el punto a mediante minimización de la suma de los errores al cuadrado del modelo ajustó bien los datos, es que existen criterios cuantitativos que representen qué tanta variabilidad presente en la variable de respuesta fue explicada por el modelo (Gutiérrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008).

- Raíz de error cuadrado medio (**RMSE**)

Es uno de los dos indicadores de rendimiento principales para un modelo predictivo de regresión. Mide la diferencia media entre los valores previstos por el modelo predictivo y los valores reales. Proporciona una estimación de la capacidad del modelo predictivo para predecir el valor (precisión). Se calcula como:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (3.7)$$

- Coeficiente de determinación **R²**

Se interpreta como la proporción de la variabilidad de los datos que es explicada por el modelo, y se calcula según la ecuación (3.8).

$$R^2 = \frac{\text{Variabilidad explicada por el modelo}}{\text{Variabilidad total}} = \frac{SC_R}{S_{yy}} \quad (3.8)$$

Donde SC_R y S_{yy} se calculan según las ecuaciones (3.9) y (3.10), respectivamente, con \bar{y} como el promedio de todos los datos observados:

$$SC_R = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (3.9)$$

$$S_{yy} = SC_E + SC_R \quad (3.10)$$

Donde $0 < R^2 \leq 1$, mientras que si R^2 es más cercano a 1, se puede decir que la variabilidad explicada por el modelo se acerca a la existente en los datos observados, por lo que la calidad del ajuste podría ser satisfactoria.

- Coeficiente de determinación ajustado R_{ajustado}^2

Este coeficiente se calcula según la ecuación (3.11).

$$R_{\text{ajustado}}^2 = \frac{CM_{\text{Total}} - CM_E}{CM_{\text{Total}}} \quad (3.11)$$

Donde el cuadrado medio total, CM_{Total} , se obtiene al dividir la suma de los cuadrados totales S_{yy} , entre sus grados de libertad ($n - 1$), con n el total de observaciones, y el cuadrado medio del error, CM_E , al dividir la suma de cuadrados del error en sus grados de libertad ($n - p$). En general, para fines de predicción se recomienda un coeficiente de determinación ajustado de al menos 0.7.

- Media del error absoluto (**mea**)

Otra forma de medir la calidad del ajuste es a través de la media del valor absoluto de los residuos según la ecuación (3.12).

$$\text{mea} = \frac{\sum_{i=1}^n |e_i|}{n} \quad (3.12)$$

Mientras mejor sea el ajuste, los residuos serán más pequeños y, en consecuencia, también la mea tenderá a ser más pequeña. La mea es útil para ver cuánto falla en promedio el modelo al hacer la estimación de la variable de respuesta.

4 Resultados y Discusión

4.1 Concentración molar de Subtilisina en Alcalase 2.5L

La recta obtenida mediante el procedimiento de titulación del sitios activos en Alcalase 2.5L (Subtilisina) se observa en la gráfica de la Figura 4-1.

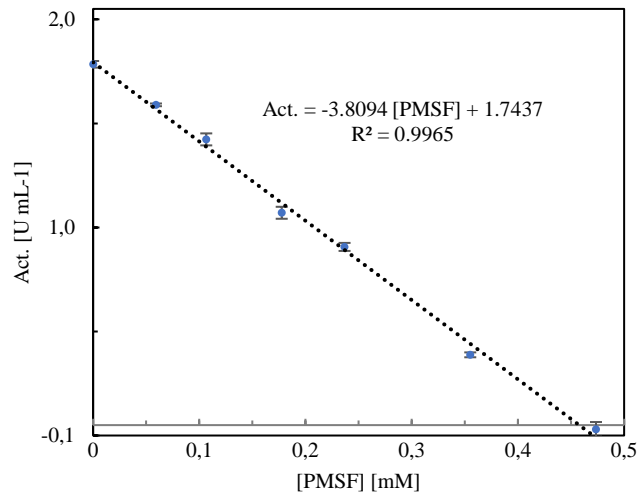


Figura 4-1: Ensayo de actividad para titular la concentración de enzima presente en el preparado enzimático Alcalase 2.5L.

Con la ecuación de la recta que se obtiene mediante la estimación lineal de los puntos experimentales se predice la concentración de PMSF requerida para inactivar completamente a la proteasa presente en la dilución de Alcalase 2.5L empleada. En este punto se cumple que los moles de PMSF son equivalentes a los moles de Subtilisina, ya que esta proteasa posee un solo sitio activo. Considerando la dilución empleada de Alcalase 2.5L y el volumen que se añadió de enzima en el procedimiento experimental a la mezcla PMSF-proteasa, se calcula la concentración molar en el preparado enzimático, y se obtiene un valor de 30.53 [mM]. Este valor es el que se usará en el desarrollo de esta investigación para el cálculo de E_0 en todos los experimentos.

4.2 Tiempo al cual se verifica *Quasi Steady State* (*QSS*)

Para describir la cinética de la proteína de hueso de salmón mediante las ecuaciones de MM, RMM, y CS, se debe asumir *QSS*. El supuesto de *QSS* solo se cumple si el complejo enzima-sustrato (ES) se genera a la misma velocidad que se desintegra, esto generalmente se cumple cuando el cambio en el sustrato total (S_0) es insignificante ($dS_0/dt \approx 0$). En enfoques de sistemas homogéneos, donde tanto la enzima como el sustrato son solubles, el instante en que se alcanza *QSS* es casi inmediato, por lo tanto se dice que v_{ss} se calcula como dP/dt cuando $t \rightarrow 0$. Sin embargo, para sustratos sólidos e insolubles se ha demostrado que las tasas iniciales de reacción están dominadas por una fase de “explosión” (t_{jump}) previa al *QSS* que sobre estima el valor de v_{ss} , y por lo tanto se vuelve de gran importancia estimar el tiempo

en el cual se da inicio al régimen de QSS (t_{QSS}) en proteína de hueso de salmón para la aplicabilidad de los modelos cinéticos en cuestión.

Como se ha mencionado anteriormente, la concentración molar de los sitios de ataque en un sustrato sólido insoluble difiere de la de un sustrato soluble, ya que la mayoría de los sitios de ataque son inaccesibles a la degradación enzimática durante la fase inicial de reacción. Los estudios que se han realizado en celulosa, un polímero sólido de naturaleza insoluble, apuntan que para dilucidar si un sustrato tiene características de “sustrato conservante” se debe medir la concentración de producto dependiente del tiempo, y la enzima libre (E_{free}) durante reacciones de hidrólisis de aproximadamente 20 [min]. En base a la metodología propuesta es que a continuación se presenta el resultado de este experimento en la Figura 4-2. Se observa que la fracción de enzima ligada (asociada a la formación del complejo [ES]) inicialmente tiene un máximo cercano a los 60 [s] el cual se asocia al momento inicial de “explosión” (t_{jump}) para luego disminuir y estabilizarse aproximadamente desde los 260 [s] iniciada la reacción, considerando entonces que este es el tiempo donde se podría considerar el inicio del QSS (t_{QSS}). Más adelante, cuando se discuta sobre el valor estimado de Γ , se volverá a analizar el panel inferior de la Figura 4-2, para evaluar si la proteína de hueso de salmón cumple con el comportamiento de sustrato conservante.

En la Figura 4-3 se presentan los resultados al aplicar el filtro SG a las curvas de progreso de los experimentos (exp1 y exp2) expuestos en la Figura 4-2. El instante temporal en el que se detecta el inicio del régimen de QSS es a los 270 [s] y 228 [s], respectivamente. El filtro también detectó el t_{jump} a los 45 [s] y 80[s], respectivamente. El análisis numérico (SG) reprodujo y cuantificó las tendencias observadas visualmente en la Figura 4-2.

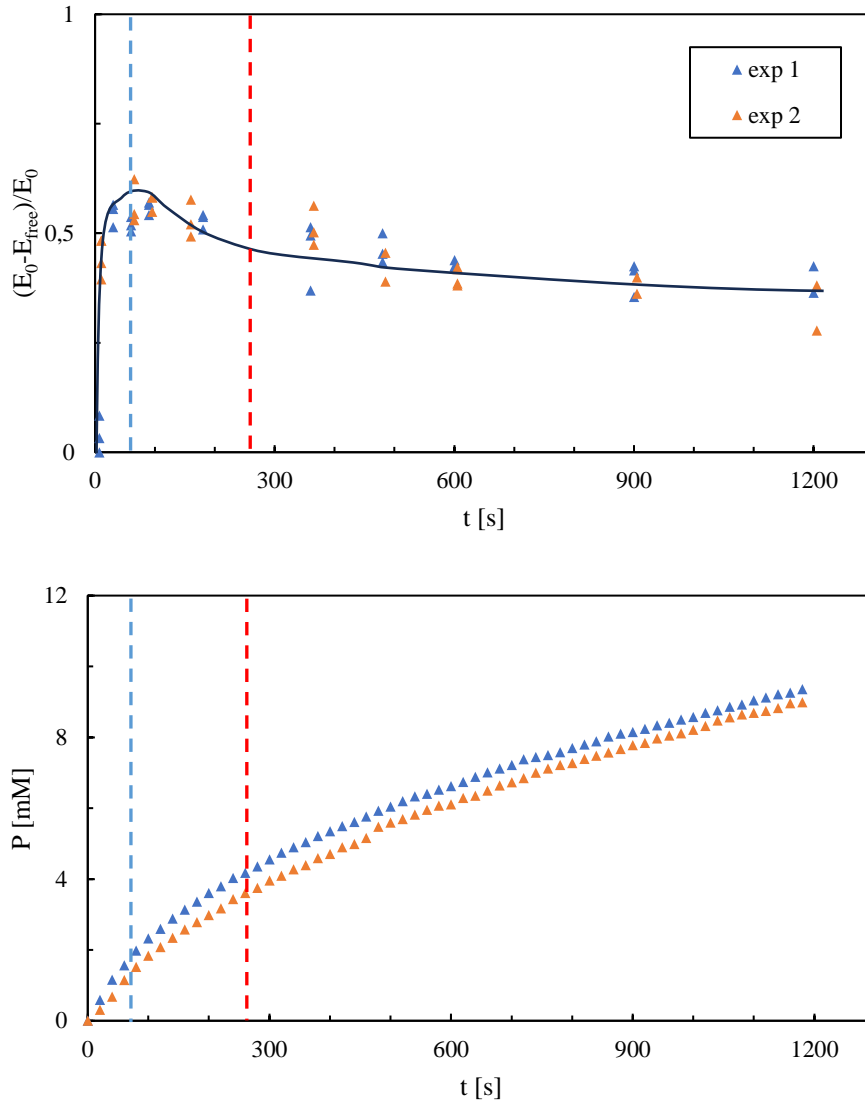


Figura 4-2: Fracción de enzima Alcalase 2.5L (Subtilisina) adsorbida sobre proteína contenidas en micropartículas de hueso de salmón ($d_{50} = 10$ [μm]) (parte superior) y concentración de producto formado (parte inferior) en función del tiempo, a una concentración inicial enzimática de 3.81 [μM] y carga inicial de sustrato de 30 [g L^{-1}]. Las líneas sólidas fueron añadidas para guiar la visualización de los datos experimentales. La línea punteada azul representa el tiempo en el que ocurre un salto en el comportamiento de la formación de complejo enzima-sustrato (t_{jump}), la línea punteada roja representa el tiempo donde se considera el inicio del QSS (t_{QSS}).

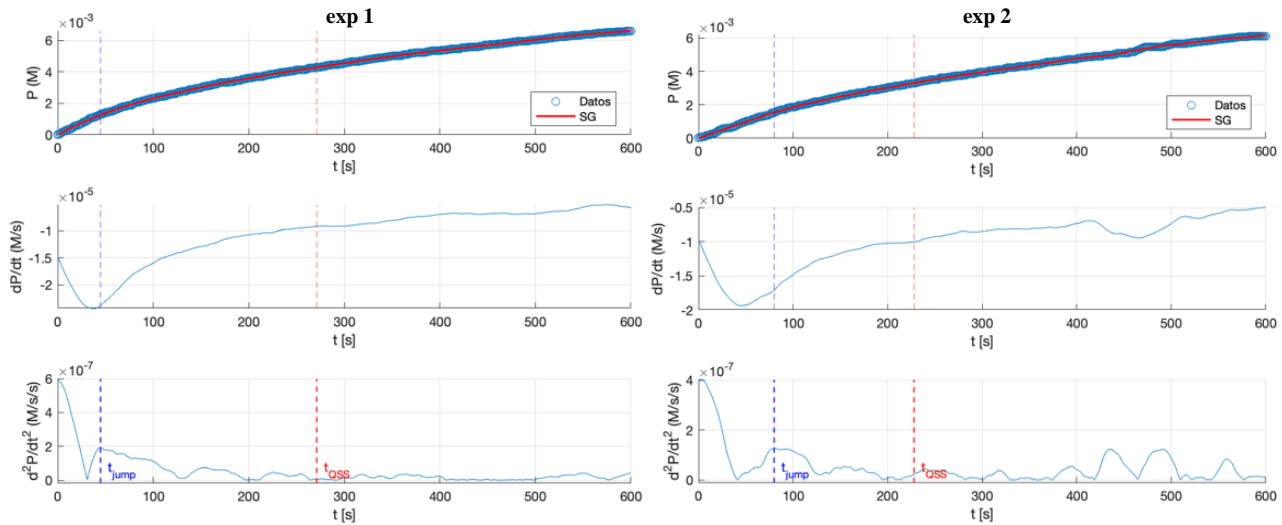


Figura 4-3: Obtención de t_{jump} y t_{QSS} mediante el filtro de SG para los experimentos a una concentración inicial enzimática de $3.81 \text{ } [\mu\text{M}]$ y carga inicial de sustrato de $30 \text{ } [\text{g L}^{-1}]$.

El análisis numérico con el filtro SG se empleó en todos los experimentos realizados con el enfoque de RMM (esto debido a un análisis que se discutirá posteriormente). Los tiempos t_{QSS} obtenidos se graficaron en la Figura 4-4. En esta investigación se consideró que el tiempo de inicio de QSS para el cálculo de v_{SS} será el tiempo máximo calculado, es decir $t_{QSS} = 300 \text{ } [s]$, ya que de esta forma se garantiza que todos los experimentos estén bajo este régimen.

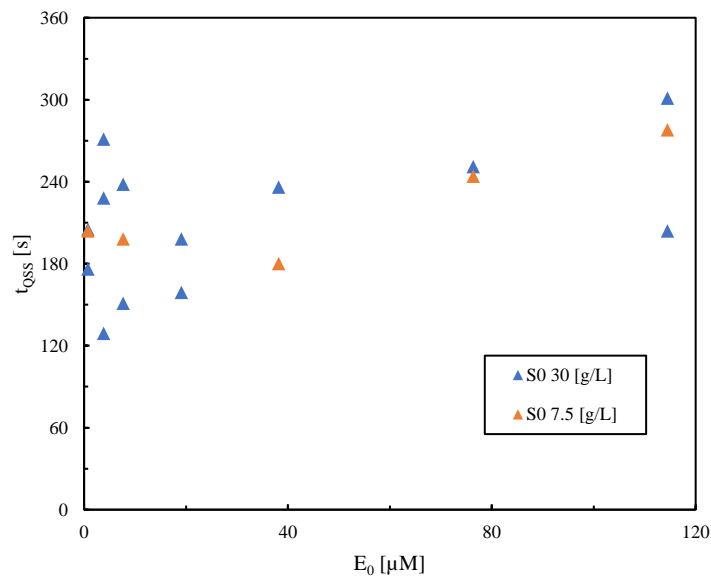


Figura 4-4: t_{QSS} obtenidos mediante el análisis numérico (SG) para los experimentos con el enfoque de RMM.

4.3 Protocolo experimental para encontrar los parámetros cinéticos del modelo CS (k_2 , K_m , y Γ)

4.3.1 Experimentos para análisis de Michaelis-Menten (MM)

Una de las principales limitaciones experimentales para analizar el enfoque de MM, es que el hueso de salmón ($d_{50} = 10[\mu\text{m}]$) para concentraciones superiores a 15 % (m/m) tiende a aglomerarse, por lo que dificulta las mediciones que permiten el cálculo de velocidad inicial de reacción según la metodología propuesta con pH-Stato. A continuación, en la Figura 4-5 se presentan los resultados obtenidos de las velocidades iniciales de reacción cuando la reacción alcanza QSS . Se ajustó el modelo de MM a cada experimento por separado, y sus parámetros se presentan en la Tabla 4-1.

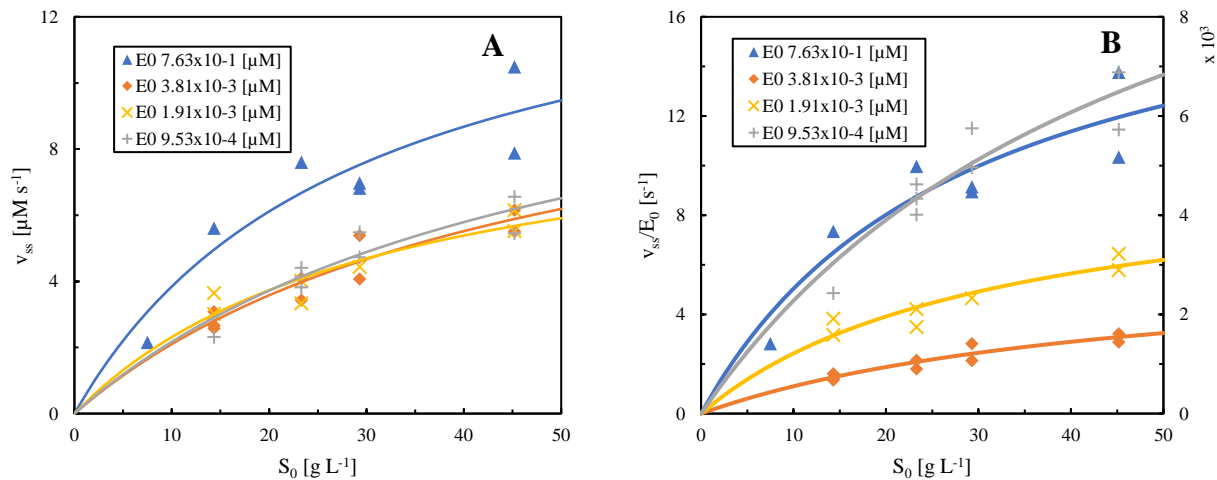


Figura 4-5: En el panel A se muestran los ajustes del modelo de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de v_{ss} en QSS para cada E_0 . En el panel B se muestran los mismos ajustes, normalizado por E_0 . Considerar para el panel B que en el eje de las ordenadas izquierdo se leen los valores de v_{ss}/E_0 para la concentración $7.63 \times 10^{-1} [\mu\text{M}]$, y las demás concentraciones se leen en el derecho.

En la Figura 4-5 se observa que es necesario experimentar con concentraciones de sustrato mayores a $45 [\text{g L}^{-1}]$ para obtener información experimental sobre la saturación de la enzima, lo cual no es viable por el comportamiento físico de la muestra antes mencionado (se aglomera). A su vez, si se disminuye la concentración enzimática en órdenes de magnitud, tampoco se visualiza la saturación enzimática. En el panel B se observa que el criterio de Michaelis-Menten en que la concentración de sustrato supera en creces la concentración inicial de enzima tampoco estaría cumpliéndose, ya que de ser así, no se observaría una dependencia de E_0 en cada corrida experimental $\left(\frac{v_{ss}^{MM}}{E_0} = \frac{k_2 S_0}{S_0 + \frac{K_m}{\Gamma}}\right)$. Por lo tanto, tal y como se estudió en el caso de la celulosa (Kari et al., 2017), el enfoque de MM desde un punto de vista experimental es más complejo de lograr para un sustrato sólido, en este caso, proteína de hueso de salmón.

Tabla 4-1: Parámetros obtenidos del ajuste al modelo de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de v_{ss} en QSS para cada E_0 .

E_0 [μM]	k_2 [s^{-1}]	$\pm\text{error}$	K_m [g L^{-1}]	$\pm\text{error}$
7.63×10^{-1}	1.96×10^1	5.80	28.9	17.8
3.81×10^{-3}	3.16×10^3	7.81×10^2	47.4	19.1
1.91×10^{-3}	5.07×10^3	1.15×10^3	31.8	13.9
9.53×10^{-4}	1.37×10^4	4.20×10^3	50.1	25.0

4.3.2 Experimentos para análisis de Reversa de Michaelis-Menten (RMM)

Tal y como se mencionó anteriormente, para sustratos sólidos e insolubles como la celulosa, se han obtenido mejores resultados para el análisis de su cinética enzimática mediante experimentos donde la concentración inicial de enzima supere en creces la concentración inicial del sustrato (enfoque de RMM). A continuación se exponen los resultados experimentales obtenidos al hidrolizar proteína de hueso de salmón mediante la acción catalítica de Subtilisina (Alcalase 2.5L).

En la Figura 4-6 se grafica el ajuste al modelo de RMM. En el panel B se observa el cumplimiento del criterio de saturación de sustrato, dado que al normalizar los datos experimentales y el modelo de RMM por S_0 , los datos experimentales se alinean a una única tendencia, marcada por el ajuste del modelo, y no dependen de S_0 ($\frac{v_{ss}^{RMM}}{S_0} = \frac{k_2 \Gamma E_0}{E_0 + K_m}$).

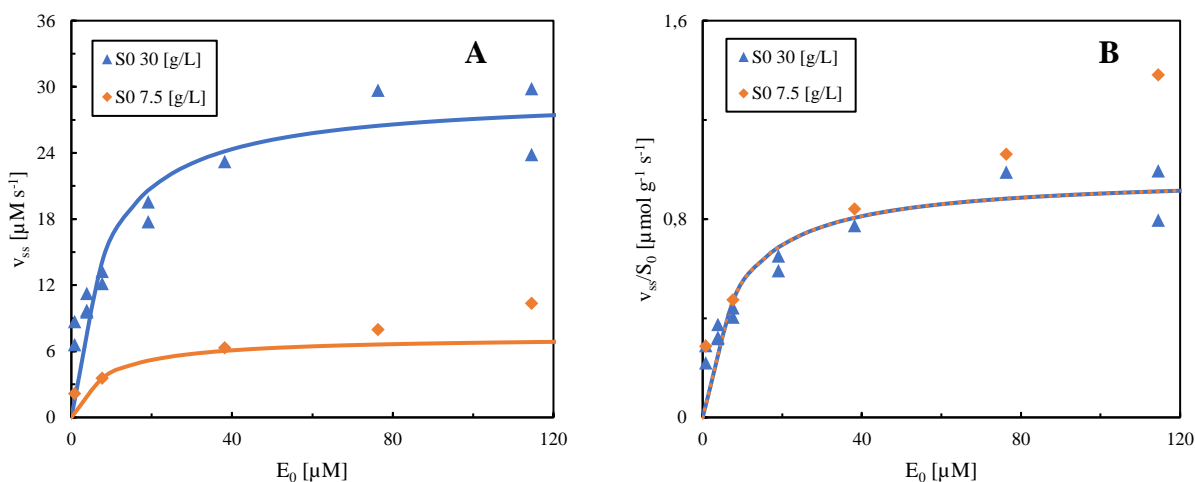


Figura 4-6: En el panel A se muestra el ajuste del modelo de Reversa de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de v_{ss} en QSS . En el panel B se muestran el mismo ajuste, normalizado por S_0 .

Los parámetros estimados por el ajuste se presentan a continuación en la Tabla 4-2, los errores de los parámetros provienen de la matriz de covarianza del ajuste no lineal.

Tabla 4-2: Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste al modelo de Reversa de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de v_{ss} en QSS .

Parámetro	Valor	\pm error
$k_2\Gamma$ [$\mu\text{mol g}^{-1}\text{s}^{-1}$]	0.824	0.053
K_m [μM]	7.39	1.74

Dado que el enfoque MM fue descartado para estimar los parámetros cinéticos del modelo CS en conjunto con el modelo RMM, es que se requiere estimar k_2 por separado para desacoplar Γ y k_2 del ajuste del modelo de RMM. Se empleará entonces un enfoque basado en RMM y la medición de enzima libre en QSS ($E_{\text{free},QSS}$) para obtener k_2 .

4.3.3 Procedimiento seleccionado para establecer el protocolo experimental para encontrar los parámetros cinéticos del modelo CS (k_2 , K_m , y Γ)

Para estimar k_2 se utilizaron los resultados del experimento donde se midió E_{free} en el tiempo, y se consideraron las concentraciones de enzima libre medidas posterior al $t_{QSS} = 300$ [s]. Se estimó k_2 como el promedio obtenido al calcular en cada punto este parámetro según lo planteado en la ecuación (2.15) como: $k_2 = \frac{v_{ss}}{E_0 - E_{\text{free},QSS}}$. Los resultados se presentan a continuación en la Figura 4-7.

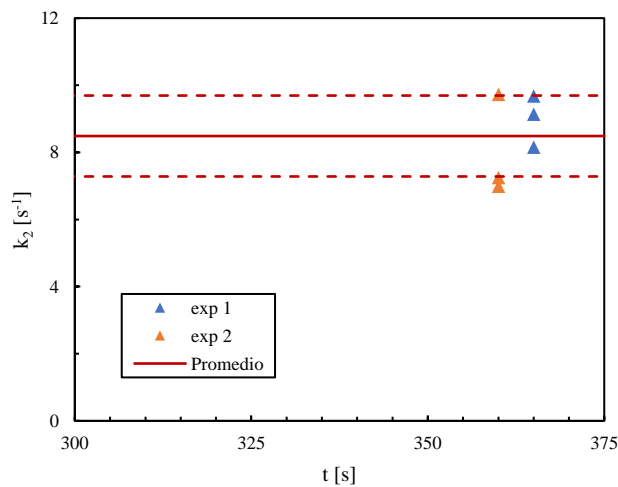


Figura 4-7: Resultados experimentales para estimar k_2 mediante la medición de enzima libre en QSS .

Mediante esta metodología se obtuvo $k_2 = 8.49 \pm 0.49$ [s^{-1}], cuyo margen de error fue calculado como el intervalo de confianza (IC) con 95% de certeza. Considerando k_2 fijo se ajustó el modelo RMM a los datos experimentales (ver Figura 4-8) y se obtuvieron los parámetros que se exponen a continuación en la Tabla 4-3. En cuanto a los indicadores de calidad del ajuste, el modelo RMM explica aproximadamente el 89% de la variabilidad observada (R^2) en v_{ss} , como también de que la cantidad de parámetros ajustados mantiene una buena calidad explicativa (R_{ajustado}^2). En cuanto al RMSE, este cuantifica la dispersión

promedio de los residuos, considerando que la escala de v_{ss} de los experimentos, este representa cerca de un 10% de las velocidades más altas, indicando una buena precisión pero con tendencia a errores sistemáticos en los extremos. En cuanto al mae, en promedio las predicciones del modelo de RMM se desvían menos de $2 [\mu\text{M s}^{-1}]$ de los valores experimentales, mostrando que los errores son moderados y no hay valores atípicos extremos.

Tabla 4-3: Parámetros cinéticos obtenidos del ajuste al modelo de Reversa de Michaelis-Menten a los resultados experimentales de v_{ss} en QSS , con $k_2 = 8.49 \pm 0.49 [\text{s}^{-1}]$ obtenido mediante la cuantificación de $E_{free,QSS}$.

Modelo	$\Gamma [\mu\text{mol g}^{-1}]$	$K_m [\mu\text{M}]$	RMSE [$\mu\text{M s}^{-1}$]	R^2	$R^2_{ajustado}$	mae [$\mu\text{M s}^{-1}$]
RMM	$9.71 \times 10^{-2} \pm 6.23 \times 10^{-3}$	7.40 ± 1.74	2.33	0.8895	0.8761	1.82

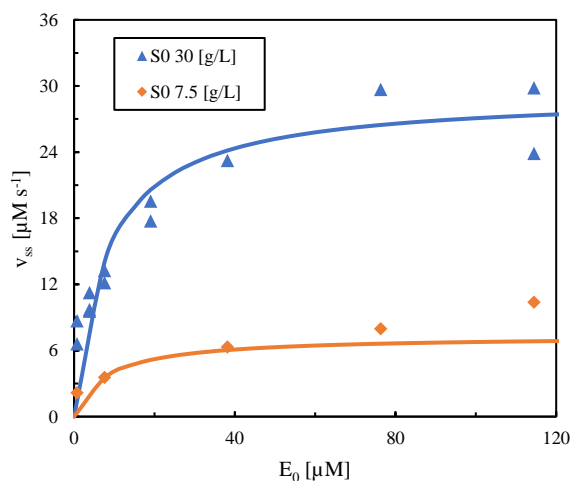


Figura 4-8: Ajuste del modelo RMM a los datos experimentales mediante regresión no lineal, con $k_2 = 8.49 \pm 0.49 [\text{s}^{-1}]$ obtenido mediante la cuantificación de $E_{free,QSS}$.

4.4 Estimación de parámetros cinéticos (k_2 , K_m , y Γ) mediante el modelo de conservación de sustrato (CS)

A continuación se presentan los resultados del ajuste de los datos experimentales que se emplearon para el ajuste de RMM al modelo CS, mediante regresión no lineal. Andersen et al. (2018) propuso que el enfoque experimental para ajustar el modelo CS por regresión no lineal es cuando no hay un exceso significativo de enzima ni de sustrato, por lo que, ya teniendo en cuenta que se está en un régimen donde predomina la concentración de enzima por sobre la de sustrato, es que se ajusta el modelo CS con k_2 fijado al valor obtenido en los experimentos previos, con el fin de ajustar dos parámetros y disminuir la correlación existentes entre los parámetros del modelo cuando hay un exceso de enzima o de sustrato.

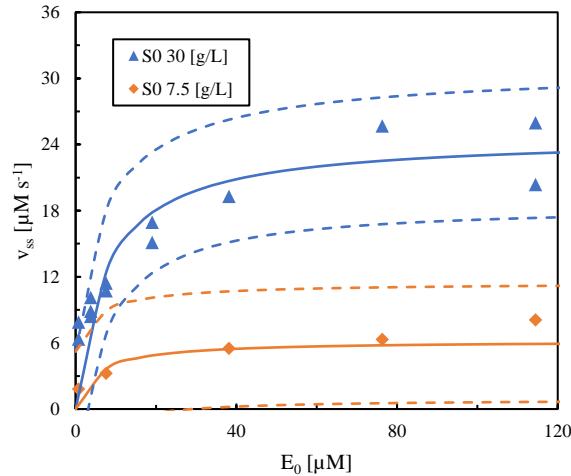


Figura 4-9: Ajuste del modelo CS para obtener Γ y K_m , con $k_2 = 8.49 \pm 0.49 [s^{-1}]$ obtenido mediante la cuantificación de $E_{free,QSS}$. Las líneas punteadas representan el intervalo de predicción del modelo con un 95% de certeza.

En la Figura 4-9 se observa el ajuste de los datos experimentales al modelo CS, considerando además el intervalo de predicción del modelo con un 95% de certeza, lo que quiere decir que dentro de ese intervalo es muy probable que se ubiquen futuros datos a las mismas condiciones del experimento. Al analizar los parámetros obtenidos en la Tabla 4-4 y la bondad de ajuste, se observa que el modelo CS explica aproximadamente el 89% de la variabilidad observada (R^2) en v_{ss} , y que la cantidad de parámetros ajustados mantiene una buena calidad explicativa, al igual que ocurrió en RMM. El RMSE disminuyó levemente en comparación al ajuste por medio de RMM, al igual que el mae, lo que da cuenta de que CS captura de mejor manera los datos experimentales en todo el rango.

El valor de K_m ($4.50 \pm 1.59 [\mu M]$) obtenido se encuentra dentro del rango reportado para Subtilisina en estudios cinéticos con péptidos modelo (Ruan et al., 2008), donde se describen valores entre $0.6 - 156 [\mu M]$, dependiendo de la secuencia del sustrato y la variante enzimática. Esto indica una afinidad elevada de la enzima hacia los sitios disponibles de ataque del sustrato. Aun cuando se empleó una matriz proteica más compleja (proteína de hueso de salmón), la buena afinidad podría deberse al reducido tamaño de partícula ($d_{50} = 10[\mu m]$), que ofrece una amplia superficie específica y facilita el acceso de la enzima a regiones expuestas ricas en enlaces peptídicos susceptibles de hidrólisis. Esto sugiere que la morfología del sustrato y la disponibilidad superficial de los sitios catalíticos juega un rol importante en la afinidad observada.

Tabla 4-4: Parámetros cinéticos del modelo CS ajustado mediante regresión no lineal para los datos experimentales con enfoque en RMM $k_2 = 8.49 \pm 0.49 [s^{-1}]$.

Modelo	$\Gamma [\mu mol g^{-1}]$	$K_m [\mu M]$	RMSE [$\mu M s^{-1}$]	R^2	$R^2_{ajustado}$	mae [$\mu M s^{-1}$]
CS	$9.70 \times 10^{-2} \pm 5.50 \times 10^{-3}$	4.50 ± 1.59	2.32	0.8907	0.8747	1.84

En la Tabla 4-5 se presentan valores de Γ calculados para sustratos sólidos insolubles como la celulosa (Avicel) con diferentes enzimas celulolíticas, y se enseña además el resultado de esta investigación para la proteína de hueso de salmón.

Tabla 4-5: Valores de Γ para celulosa (Kari et al., 2017) y proteína de hueso de salmón ($d_{50} = 10$ [μm]).

Sustrato	Enzima	Γ [$\mu\text{mol g}^{-1}$]
Avicel (celulosa)	Cel7A _{WT}	0.22
Avicel (celulosa)	Cel7A _{CD}	0.027
Avicel (celulosa)	Cel7A _{W38A}	0.013
Proteína de hueso de salmón	Subtilisina (Alcalase 2.5L)	0.097

Se dice que la diferencia notoria en los valores de Γ para el mismo sustrato según la enzima es debido a la especificidad de cada una pero en base a la superficie del sustrato, a diferencia de la especificidad típicamente asociada a la estructura química del sustrato. El valor de Γ estimado para la proteína de hueso de salmón es bastante similar a lo obtenido por Kari et al., (2017) en el caso de la celulosa. Si bien ambos sustratos son polímeros, sólidos, e insolubles, es importante considerar que la proteína presente en el hueso de salmón está mineralizada con apatita, por ello el sustrato no está en forma pura, sino en conjunto con la fase mineral, condicionando posiblemente la accesibilidad de la enzima, y por ende, es esperable que el valor de este parámetro sea menor o similar al de la celulosa. Ahora bien, si se considerara que toda la proteína presente en los gránulos de hueso está disponible para degradarse en la superficie, y esta corresponde en su totalidad a colágeno, cuyo peso molecular es de aproximadamente 300 [Da] (García S. et al., 2021), entonces se podría estimar un límite superior para Γ , el cual es de aproximadamente $\Gamma_{\text{máx}} = 0.904$ [$\mu\text{mol g}^{-1}$]. En base a lo anterior, se podría decir que el valor obtenido de Γ representa que cerca del 10% de la proteína se encontraba disponible en la superficie, cuyo diámetro de partícula medio es de $d_{50} =$

10 [μm], y se podría evaluar a futuro como varía este parámetro en función del tamaño de partícula medio.

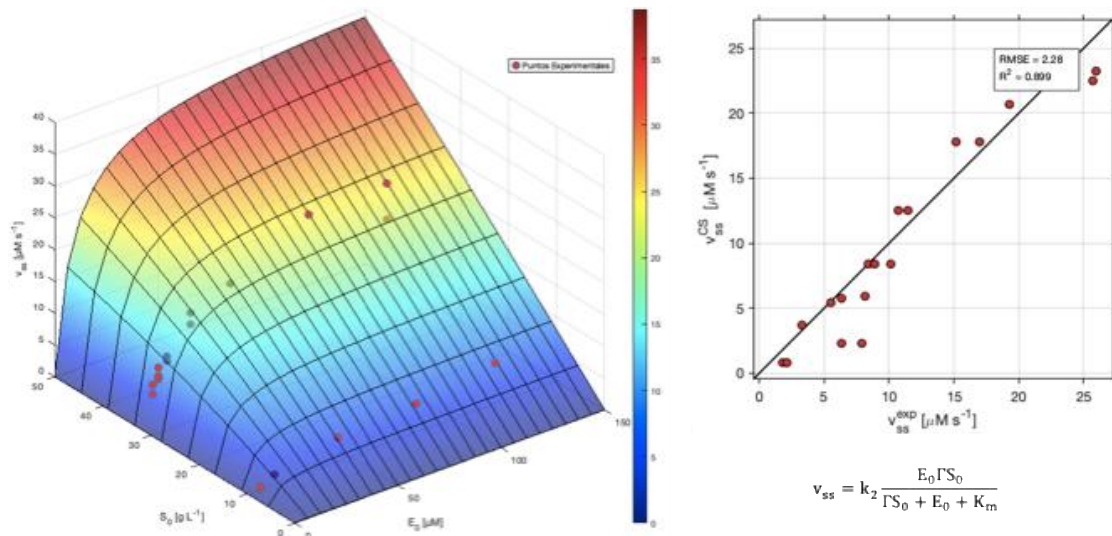


Figura 4-10: Superficie de respuesta del modelo CS junto a los datos experimentales de esta investigación. En el cuarto panel se presenta el análisis de predicción de modelo frente a los datos experimentales.

En la Figura 4-10 se presenta la superficie de respuesta del modelo junto con los datos experimentales de este estudio. El modelo en el rango bajo sobrestima la velocidad inicial de reacción según lo que se observa en el análisis de predicción del modelo frente a los datos experimentales de la Figura 4-10, sin embargo, se observa una tendencia en la mayoría de los puntos experimentales a ser predichos por el modelo, donde cerca del 90% de la variabilidad de los datos es explicada por el modelo. Con estos resultados se puede decir que la cinética de catálisis enzimática de proteína de hueso de salmón en un medio acuoso es bien descrita por el modelo de CS, ya que, como se observa en la gráfica, los datos experimentales se distribuyen sobre y bajo la superficie siguiendo la tendencia marcada por el modelo. Ahora bien, volviendo a la Figura 4-2, al calcular S_0 en concentración molar de sitios accesibles para la enzima, se tiene que $S_0 = 2.91$ [μM], lo que da cuenta de que la proteína de hueso de salmón se comporta como sustrato conservante, ya que prácticamente al instante inicial de la reacción el sustrato ya debería haberse agotado, sin embargo la reacción sigue generando producto incluso más allá de los 20 [min].

5 Conclusiones

De este estudio se resuelve que la cinética de hidrólisis enzimática de proteína de hueso de salmón ($d_{50} = 10 \text{ } [\mu\text{m}]$) es descrita por el modelo CS. Se estimó la concentración molar de la enzima Subtilisina en el preparado enzimático Alcalase 2.5 L. Se estimó también el tiempo donde se alcanza QSS y se garantiza ese régimen, incorporando una herramienta matemática para el cálculo de este, además del análisis ya propuesto por otros autores. Para hidrolizar hueso mediante la acción de la enzima Subtilisina (Alcalase 2.5L), se recomienda un análisis tipo RMM o, al menos, sin exceso de sustrato, ya que llevar experimentalmente a condiciones de MM es poco práctico: exige E_0 muy bajas y S_0 muy altas, siendo esto último poco viable por la aglomeración y las propiedades físicas del polvo de hueso de salmón. Se dilucidó una metodología que permite estimar los parámetros cinéticos del modelo CS. Un aspecto importante de los resultados de este estudio es que se logró estimar la densidad de moles sitios de ataque por carga másica de sustrato (proteína presente en polvo de hueso de salmón $d_{50} = 10 \text{ } [\mu\text{m}]$), un parámetro clave para la caracterización cinética y el diseño de procesos enzimáticos empleando la proteína de hueso de salmón como sustrato sólido e insoluble, y sus posteriores aplicaciones tecnológicas para la industria alimentaria.

Se recomienda replicar este estudio a diferentes tamaños de partícula de polvo de hueso de salmón para evaluar la densidad de moles de sitios de ataque por carga másica de sustrato, en función del tamaño de partícula medio, y así estudiar como escalar este proceso de manera más eficiente.

6 Referencias

- Andersen, M., Kari, J., Borch, K., & Westh, P. (2018). Michaelis–Menten equation for degradation of insoluble substrate. *Mathematical Biosciences*, 296, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2017.11.011>
- Consejo Del Salmón Chile. (2024). *REPORTE DE EXPORTACIONES DE SALMÓN 2024*. www.consejodelsalmon.cl
- Contraloría General de la República. (2020). *D.S. N°64*. <https://www.subpesca.cl/portal/615/w3-article-110257.html>
- Coulter, T. P. (1998). *Manual de química y bioquímica de los alimentos* (S. A. Acribia, Ed.; Segunda edición).
- Departamento de análisis sectorial. (2022). *INFORME SECTORIAL DE PESCA Y ACUICULTURA CONSOLIDADO (2021-2022)*. www.subpesca.cl
- Estrada-López, H. H., Saumett-España, H. G., Iglesias-Navas, M. A., Bahamón, M. J., Cáceres-Martelo, A. M., Restrepo Flórez, C. E., Pérez Lavalle, L., Bolívar Anillo, H. J., & Díaz Pérez, A. (2017). Productos de confitería nutracéutica. En *Productos de confitería nutracéutica*. Ediciones Universidad Simón Bolívar. <https://doi.org/10.17081/bonga.2204>
- FAO. (2022). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. En *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022*. FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>
- Fundación Española de la Nutrición. (s. f.). *Pescados*. Recuperado 9 de abril de 2024, de <https://www.fen.org.es/storage/app/media/flipbook/mercado-alimentos-fen/011-Pescados.pdf>
- Gallagher, N. B. (s. f.). *Savitzky-Golay Smoothing and Differentiation Filter*. www.Eigenvector.com
- García Martínez, E., & Fernández Segovia, I. (s. f.). *Determinación de proteínas de un alimento por el método Kjeldahl. Valoración con un ácido fuerte*.
- García S., C. O., Zamorano A., J. C., Martínez P, M., Scheuren A., S. M., & Mazorra M., M. A. (2021). *Isolation and properties of collagen extracted from mixed by-products obtained from different fish species*. <http://biotecnia.unison.mx>
- Gutiérrez Pulido, H., & de la Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. www.FreeLibros.org
- Jung, W.-K., Lee, B.-J., & Kim, S.-K. (2006). Fish-bone peptide increases calcium solubility and bioavailability in ovariectomised rats. *British Journal of Nutrition*, 95(1), 124–128. <https://doi.org/10.1079/bjn20051615>
- Kari, J., Andersen, M., Borch, K., & Westh, P. (2017). An Inverse Michaelis-Menten Approach for Interfacial Enzyme Kinetics. *ACS Catalysis*, 7(7), 4904–4914. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b00838>
- Kari, J., Christensen, S. J., Andersen, M., Baiget, S. S., Borch, K., & Westh, P. (2019). A practical approach to steady-state kinetic analysis of cellulases acting on their natural insoluble substrate. *Analytical Biochemistry*, 586. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113411>
- Kjeldahl Method for Determination of Nitrogen*. (s. f.).
- Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189266>

- Lagouri, V. (2019). Introductory Chapter: Functional Foods. En *Functional Foods*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82304>
- Li, J., Yin, T., Xiong, S., Huang, Q., You, J., Hu, Y., Liu, R., & Li, Y. J. (2020). Mechanism on releasing and solubilizing of fish bone calcium during nano-milling. *Journal of Food Process Engineering*, 43(4). <https://doi.org/10.1111/jfpe.13354>
- Liaset, B., Julshamn, K., & Espe, M. (2003). Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. *Process Biochemistry*, 38(12), 1747–1759. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00251-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00251-0)
- Malde, M. K., Bügel, S., Kristensen, M., Malde, K., Graff, I. E., & Pedersen, J. I. (2010). *Calcium from salmon and cod bone is well absorbed in young healthy men: a double-blinded randomised crossover design*. <http://www.nutritionandmetabolism.com/content/7/1/61>
- Naciones Unidas. (2018). *La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe*. www.issuu.com/publicacionescepal/stacks
- Olsen, R. L., Toppe, J., & Karunasagar, I. (2014). Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. En *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 36, Número 2, pp. 144–151). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.007>
- Pérez, A., Ruz, M., García, P., Jiménez, P., Valencia, P., Ramírez, C., Pinto, M., Nuñez, S. M., Park, J. W., & Almonacid, S. (2024). Nutritional Properties of Fish Bones: Potential Applications in the Food Industry. En *Food Reviews International* (Vol. 40, Número 1, pp. 79–91). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2153136>
- Qi, W., & He, Z. (2006). Enzymatic hydrolysis of protein: Mechanism and kinetic model. *Frontiers of Chemistry in China*, 1(3), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s11458-006-0026-9>
- Ruan, B., London, V., Fisher, K. E., Gallagher, D. T., & Bryan, P. N. (2008). Engineering substrate preference in subtilisin: Structural and kinetic analysis of a specificity mutant. *Biochemistry*, 47(25), 6628–6636. <https://doi.org/10.1021/bi800089f>
- SalmonChile. (2021, noviembre 26). *El ciclo productivo del salmón, una cadena de valor completa - SalmonChile A.G.* <https://www.salmonchile.cl/noticias/el-ciclo-productivo-del-salmon-una-cadena-de-valor-completa/>
- SalmonChile. (2023). *Principales Resultados Primer Semestre 2023*.
- Stryer, L., Berg, J. M., & Tymoczko, J. L. (2014). *Bioquímica: curso básico* (Reverté).
- Tang, J. Y. (2015). On the relationships between the Michaelis-Menten kinetics, reverse Michaelis-Menten kinetics, equilibrium chemistry approximation kinetics, and quadratic kinetics. *Geoscientific Model Development*, 8(12), 3823–3835. <https://doi.org/10.5194/gmd-8-3823-2015>
- Valencia, P. L., Solis, T., Rojas, P., Ibañez, F., Astudillo-Castro, C., Pinto, M., & Almonacid, S. (2019). Proteolytic susceptibility of food by-product proteins: An evaluation by means of a quantitative index. *Process Biochemistry*, 77, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.11.009>
- Valencia, P., 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>

- Valenzuela B, A. (2005). EL SALMON: UN BANQUETE DE SALUD. *Revista chilena de nutrición*, 32(1). <https://doi.org/10.4067/S0717-75182005000100001>
- Van Langen, L. M., Janssen, M. H. A., Oosthoek, N. H. P., Pereira, S. R. M., Švedas, V. K., Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (2002). Active site titration as a tool for the evaluation of immobilization procedures of penicillin acylase. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(2), 224–228. <https://doi.org/10.1002/bit.10280>
- Xie, W.-W., Tao, Y., Zhang, J., Liu, R., Zhao, S.-M., & Xiong, S.-B. (2014). *Effects of Fish Bone Powder Particle Size on Calcium Bioavailability of Fish Bone Powder-Fish Protein Hydrolysate Mixture*. 35(07). <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-201407042>

7 Anexos

7.1 Densidad de la mezcla de reacción en función de la masa de hueso de salmón $d_{50} = 10 \text{ } [\mu\text{m}]$

Dado que el hueso se comporta como un sólido insoluble en presencia de agua y el preparado enzimático, es que la muestra de reacción es considerada heterogénea (ver Figura 7-1(a)). Para las reacciones de hidrólisis enzimática, esta mezcla se mantendrá en agitación constante, a modo de mantener en suspensión el sólido y generar transitoriamente un estado homogéneo (ver Figura 7-1(b)). Si se tiene conocimiento de la masa de la mezcla de reacción (masa de hueso (m_H)+masa de agua (m_A)+masa de preparado enzimático (m_E)) se puede determinar la densidad promedio de esta mezcla, y de esta forma poder dilucidar el volumen de reacción, que es fundamental para el conocimiento de la concentración molar de la enzima, y la concentración m/V del sustrato en la mezcla de reacción para las hidrólisis enzimáticas. Tanto el sustrato como la enzima deben estar en estas unidades para el posterior ajuste de los modelos teóricos-mecanísticos de cinética de catálisis enzimática.

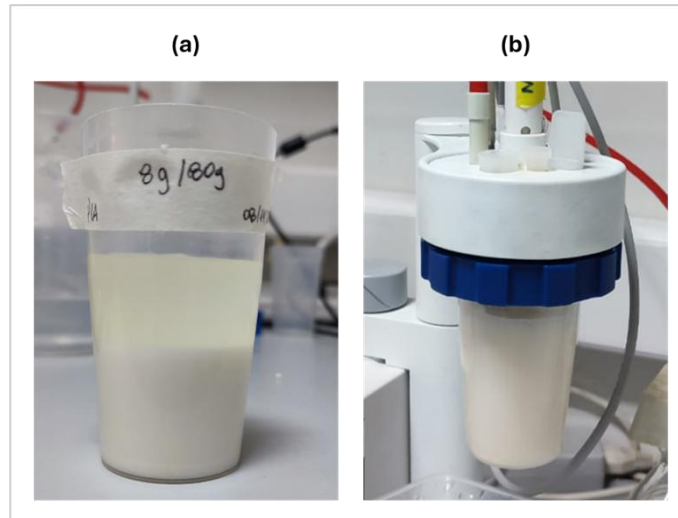


Figura 7-1: (a) Muestra de reacción sin agitación; (b) Muestra de reacción sometida a agitación.

Para determinar la densidad se toma una alícuota de 1 [mL] de muestra de reacción (en agitación constante) y se mide la masa de dicha alícuota. Luego la densidad que representa cada alícuota se calcula como:

$$\rho = \frac{\text{masa alícuota [g]}}{1[\text{mL}]} \quad (4.4)$$

Se recomienda repetir el procedimiento por muestra de reacción al menos 10 veces.

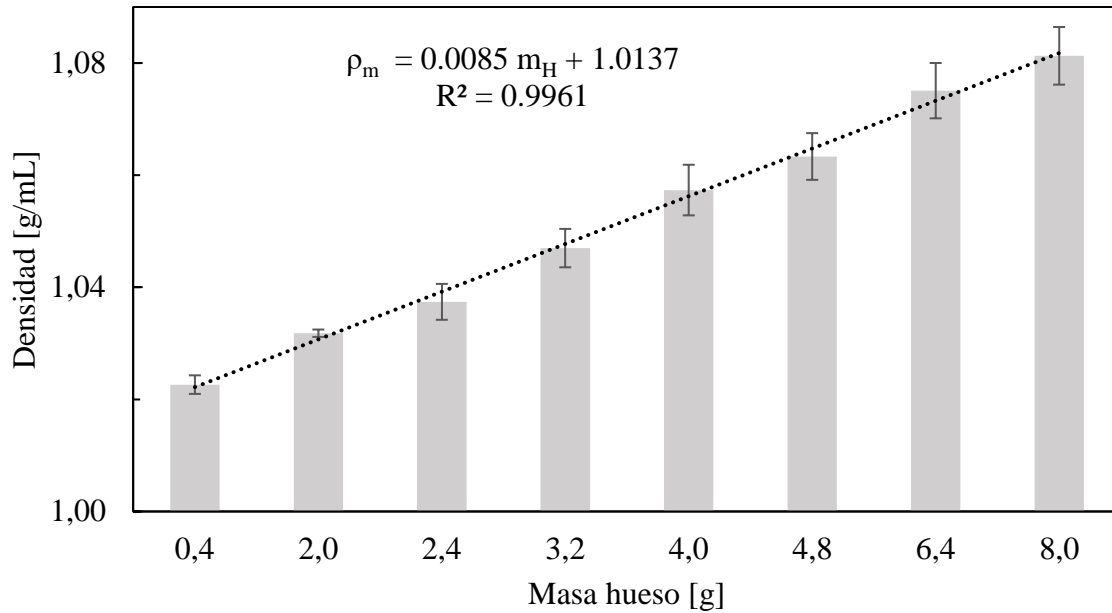


Figura 7-2: Densidad de la mezcla de reacción para los experimentos de hidrólisis enzimática de proteína de hueso de salmón con Alcalase 2,5L, en función de la masa de hueso de salmón añadido para una masa de mezcla de reacción total de 80 [g].

De la gráfica de la Figura 7-2 se obtiene la ecuación de la recta que describe el comportamiento del aumento de la densidad en función de la masa de hueso de salmón. De esta forma se puede considerar la concentración m/V de hueso en las reacciones de hidrólisis enzimática. Ahora bien, en términos de concentración de sustrato, es necesario considerar que el sustrato es la proteína presente en el hueso de salmón, la cual en su mayoría corresponde a colágeno. Mediante un experimento de cuantificación de nitrógeno Kjeldahl, se obtuvo que el contenido de proteína presente en el hueso de salmón es de $0,27 \text{ g}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{hueso}}$.

7.2 Curvas de progreso y tasa de formación de producto

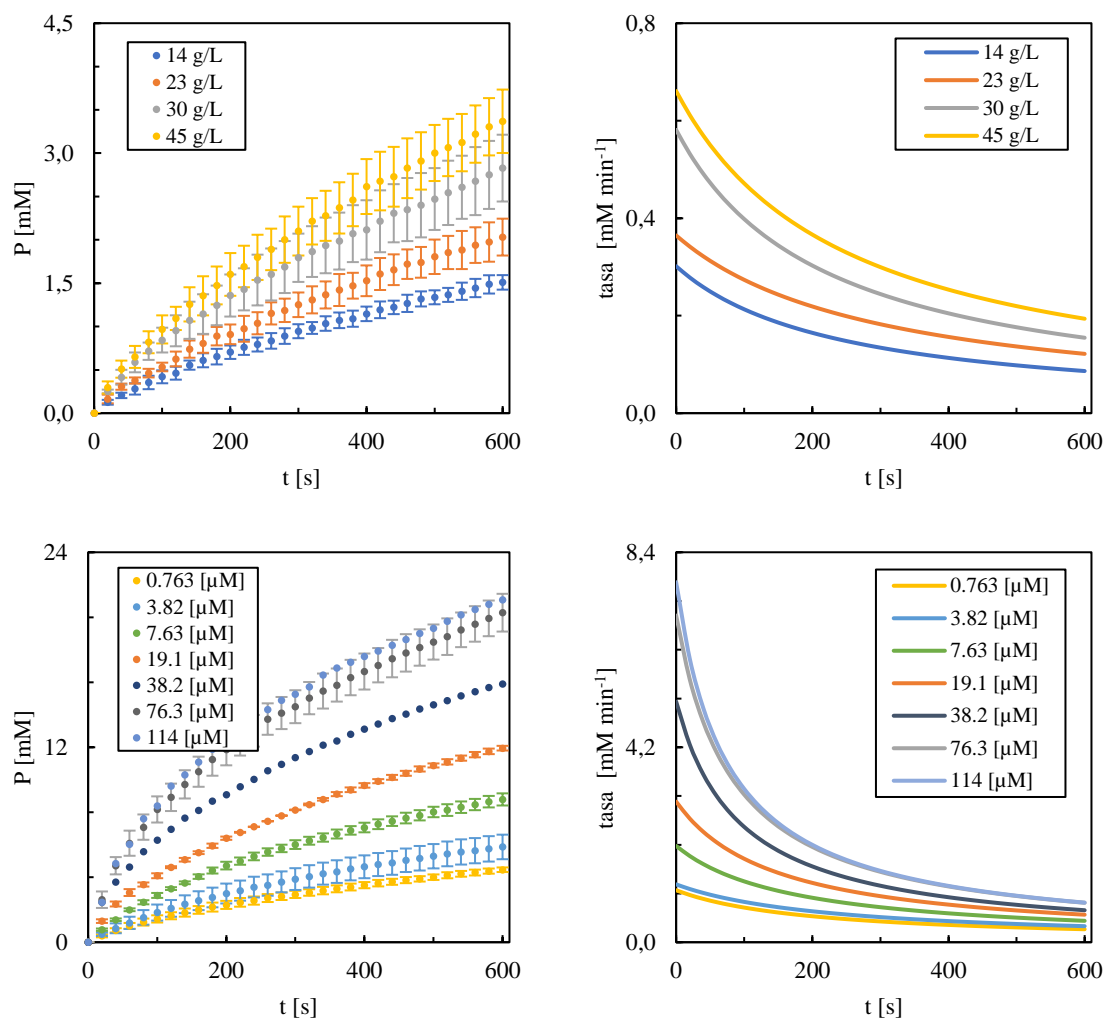


Figura 7-3: Curvas de progreso y tasa de formación de producto para los diferentes experimentos.