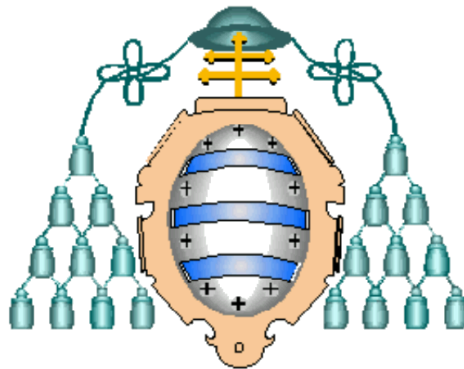


# Universidad de Oviedo

Departamento de Ingeniería Química  
y Tecnología del Medio Ambiente



Doctorado en Biotecnología Alimentaria

“Transformaciones de proteínas de sangre. Propiedades  
funcionales de materias primas y productos”

TESIS DOCTORAL

por

CARLOS ÁLVAREZ GARCÍA

2012



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: TRANSFORMACIONES DE PROTEINAS DE SANGRE. PROPIEDADES FUNCIONALES DE MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS.	Inglés: TRANSFORMATIONS OF BLOOD PROTEINS. FUNCTIONAL PROPERTIES OF RESOURCES AND PRODUCTS
2.- Autor	
<b>Nombre:</b> CARLOS ALVAREZ GARCIA	
Programa de Doctorado: Biotecnología alimentaria	
Órgano responsable: INGENIERIA QUIMICA Y TECNOLOGIA DEL MEDIO AMBIENTE	

### RESUMEN (en español)

En el presente trabajo se plantea la revalorización de la sangre de porcino procedente de macelos asturianos mediante la recuperación de sus proteínas. Esta recuperación se hace con un doble objetivo: por un lado reducir el volumen de vertido de este subproducto con una alta carga orgánica contaminante, y por otro producir derivados de la sangre con un alto valor añadido mediante el desarrollo de métodos adecuados. El trabajo se ha estructurado en tres etapas: en la primera se ha trabajado en la separación y purificación de las proteínas presentes originalmente en la sangre y en su evaluación como ingredientes alimentarios en función de sus propiedades funcionales. En las dos etapas siguientes se desarrollaron métodos de modificación de dichas proteínas con el fin de mejorar sus propiedades (conjugación con dextrano) o bien en producir hidrolizados mediante hidrólisis química o hidrólisis física.

En primer término, la sangre ha sido recogida y separada en sus dos componentes principales: fracción plasmática y fracción celular. El plasma ha sido a su vez fraccionado siguiendo una variación del método de Cohn, con lo que se consiguieron cuatro fracciones plasmáticas: FI (compuesta principalmente por fibrinógeno), FII (formada casi al completo por  $\gamma$ -globulinas), FIII (cuyas principales proteínas son  $\alpha$  y  $\beta$ -globulinas) y FIV (formada mayoritariamente por albúmina). De la fracción celular se ha extraído y purificado la hemoglobina, la proteína más abundante de la sangre, que se puede transformar en otros subproductos como globina precipitada y globina decolorada precipitada.

Con el objetivo de evaluar la aplicación de las proteínas plasmáticas y celulares a la industria alimentaria se analizaron diferentes propiedades funcionales (solubilidad,



emulsificación, gelificación, espumación) en todas las fracciones proteicas obtenidas. De este modo, en función del valor obtenido para dichas propiedades, se puede decidir qué tipo de alimentos se pueden suplementar con cada proteína.

En la segunda parte de este trabajo y buscando ampliar el rango de aplicación de las proteínas nativas, se modificó su estructura a través de la reacción de Maillard, empleando dextrano de 10kDa. De este modo se consiguió mejorar la estabilidad térmica, la capacidad emulsionante y modificar las temperaturas de gelificación de todas las proteínas conjugadas. Con estos cambios, se consiguió aumentar el rango de aplicabilidad de las proteínas sanguíneas a la industria alimentaria.

En la última parte del presente trabajo se evaluaron diferentes métodos para producir hidrolizados de hemoglobina porcina purificada. Para ello se emplearon métodos químicos (usando diversas concentraciones de HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o NaOH) y métodos físicos (presión de 4 MPa, temperaturas entre 120 y 180°C y atmósfera de oxígeno o nitrógeno). Las diferentes variables de operación fueron evaluadas para cada método en función de diversos parámetros, como el rendimiento de conversión de hemoglobina en péptidos, el tamaño final de los mismos y las propiedades funcionales y antioxidantes de cada uno de ellos. Este trabajo muestra como los métodos químicos tienen un rendimiento moderado de producción de péptidos, la mayoría de los cuales tienen un alto peso molecular. Por otro lado, los métodos físicos tienen un mayor rendimiento de producción de péptidos, originando péptidos de bajo peso molecular que presentaban unas buenas propiedades antioxidantes y funcionales.

Por tanto, en función del tipo de tratamiento utilizado (reacción de Maillard, hidrólisis química o hidrólisis física) y de las condiciones de operación del mismo, es posible emplear la sangre, considerada como un residuo en los mataderos, para conseguir un amplio rango de productos de diferentes propiedades que puedan ser aplicados en multitud de productos de alimentación.





## RESUMEN (en Inglés)

The present work deals with the revaluation of porcine blood by the recovery of its proteins. This recovery is done with two objectives: firstly to reduce the volume of waste of this product highly pollutant and other produce blood derivates with added value by developing appropriate methods. The work is structured in three stages: first stage was the purification of proteins present in the blood and its evaluation as food ingredients based on their functional properties. In the following two steps several methods were developed to modify these proteins in order to improve their properties (conjugation with dextran) or to produce haemoglobin hydrolysates through chemical or physical hydrolysis.

First, the blood was collected and separated into its two major components: plasma and cellular fraction. The plasma was fractionated following a variation of the method of Cohn, which were obtained four plasma fractions: FI (mainly composed of fibrinogen), FII (consisting almost entirely by  $\gamma$ -globulins), FIII (whose major proteins are  $\alpha$  and  $\beta$ -globulins) and FIV (comprised mostly of albumin). From cell fraction haemoglobin was extracted and purified, the most abundant protein in the blood, which can be transformed into other products such as precipitated globin and discolored precipitated globin.

In order to evaluate the application of plasma proteins and haemoglobin to the food industry were analyzed different functional properties (solubility, emulsifying, gelling, foaming). Thus, according to the value obtained for these properties, it is possible to decide what kind of foods can be supplemented with each protein. In the second part of this work and looking to expand the application range of the native proteins; their structure was modified through the Maillard reaction using dextran of 10kDa. An improving in the thermal stability and emulsifying capacity was achieved; besides the gelling temperature was notably increased. With these changes, the range of applicability of the blood proteins in the food industry was enhanced.

In the last part of this work were evaluated different methods for producing purified porcine haemoglobin hydrolysates. It was employed chemical hydrolysis (using various concentrations of HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, or NaOH) and physical methods (pressure of 4 MPa, temperatures between 120 and 180 ° C and atmospheric oxygen or nitrogen). The different operating variables were evaluated for each method based on various parameters such as the conversion yield of hemoglobin into peptides, their final size and functional properties and



antioxidants of the peptides. This work shows how chemical methods have a moderate yield producing peptides, which are high molecular weight. On the other hand, physical methods have a higher yield of peptides, forming low molecular weight peptides that showed good antioxidant properties and functional.

Therefore, depending on the type of treatment used (Maillard's reaction, physical or chemical hydrolysis) and the operating conditions of each treatment, it is possible to use blood, considered as a waste in slaughterhouses, to create a wide range of products with different properties that can be applied in many food products.

SR/A. DIRECTOR/A DE DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y TECNOLOGIA DEL MEDIO AMBIENTE/  
SR/A. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN Biotecnología  
alimentaria

“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos; camino diez pasos más y ella está diez pasos más allá. ¿Entonces, para qué sirve la utopía? Para eso, sirve para avanzar”

**Eduardo Galeano**

Siempre hay quien quisiera ser distinto,  
nadie está conforme con lo que le tocó.  
El de edad quisiera ser un niño  
y el rapaz se raspa sus pelusas en flor.

Los que nada tienen quieren algo,  
los que tienen algo quieren todavía más.  
Para pretender el mundo es largo,  
para conformarse se inventa el jamás.

La tolerancia es la pasión de los inquisidores.  
El buen ladrón quisiera no tener que robar.  
Le deben al silencio la voz los ruseñores.  
La eternidad no es más que un truco para continuar.

La libertad sólo es visible para quien la labra  
y en lo prohibido brilla astuta la tentación.  
Nacer a veces mata y ser feliz desgarrar.  
¿A quién acusaremos cuando triunfe el amor?

**Silvio Rodríguez**

Allí, donde quiero volver, tantas cosas se quedaron.  
¿A dónde he ido a parar? ¿En qué isla he naufragado?  
Allí corría tras una falda que huía despavorida.  
¿Qué habrá sido de esa niña? La recuerdo todavía.

Allí me dejé olvidadas mis chapas en algún charco.  
Ya no recuerdo cuantas cosas allí he olvidado.  
Allí crecían por las noches horribles monstruos fantasma,  
más dulces que los que ahora por las noches nos asaltan.

Si pudiera volver allí, ay, si pudiera.  
Si ya no reconozco ni el barrio, lo devoró la hormigonera.  
Allí soñaba cada día escapar por la ventana  
y andar de teja en teja por los tejados que se veían desde mi casa.  
Allí recuerdo, las ventanas eran más pequeñas.  
Ahora son grandes, enormes, y apenas miro por ellas.

**Ismael Serrano**



A toda mi familia, en el más extenso sentido de la palabra.  
Ellos definen quien soy y por ellos todo esfuerzo merece la pena.





# ÍNDICE

<b>Lista de figuras</b> .....	VIII
<b>Lista de tablas</b> .....	XII
<b>Agradecimientos</b> .....	XV
<b>Resumen</b> .....	XVII
<b>Abstract</b> .....	XIX
<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	3
<b>2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b> .....	13
<b>2.1 LAS PROTEÍNAS</b> .....	15
2.1.1 Estructura.....	15
<b>2.2 SANGRE: CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES</b> .....	18
2.2.1 Composición.....	18
2.2.2 Funciones.....	19
<b>2.3 USOS DE LA SANGRE</b> .....	20
2.3.1 Industria alimentaria.....	20
2.3.2 Fabricación de piensos.....	21
2.3.3 Laboratorio y medicina.....	22
2.3.4 Fertilizantes.....	23
2.3.5 Otros usos industriales.....	23
<b>2.4 FRACCIONES SANGUÍNEAS: PLASMA/SUERO Y CÉLULAS</b> .....	24
2.4.1 Plasma/suero.....	24
2.4.2 Fracción celular.....	26
<b>2.5 PROTEÍNAS SANGUÍNEAS</b> .....	27

2.5.1	Proteínas plasmáticas.....	27
2.5.2	Proteínas celulares: hemoglobina.....	28
2.5.3	Usos de la hemoglobina.....	30
<b>2.6 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS Y</b>		
<b>APLICACIÓN TECNOLÓGICA EN LA INDUSTRIA</b>		
<b>ALIMENTARIA.....</b>		
		31
2.6.1	Solubilidad.....	32
2.6.2	Propiedades emulsificantes.....	34
2.6.3	Propiedades espumantes.....	36
2.6.4	Propiedades gelificantes.....	37
2.6.5	Aplicación tecnológica de las propiedades funcionales de las proteínas.....	40
<b>2.7 CONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS CON HIDRATOS DE</b>		
<b>CARBONO.....</b>		
		42
2.7.1	La reacción de Maillard.....	43
2.7.2	Condiciones de la reacción.....	45
2.7.3	Cambios en las propiedades funcionales de las proteínas conjugadas.....	46
2.7.3.1	Modificación de las propiedades gelificantes.....	47
2.7.3.2	Modificación de las propiedades emulsionantes.....	47
2.7.3.3	Modificación de la solubilidad.....	48
2.7.3.4	Estabilidad térmica.....	48
<b>2.8 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.....</b>		
		49
2.8.1	Radicales libres.....	50
2.8.2	Compuestos antioxidantes.....	51

2.8.2.1 Poder de captura del radical hidroxilo.....	52
2.8.2.2 Poder reductor.....	53
2.8.2.3 Poder quelante.....	53
<b>2.9 HIDRÓLISIS HEMOGLOBINA PURIFICADA.....</b>	<b>54</b>
2.9.1 Hidrólisis de proteínas.....	54
2.9.2 Hidrólisis química.....	57
2.9.3 Hidrólisis a altas temperaturas y presión moderada en atmosfera controlada.....	58
2.9.3.1 Efecto de la presión en la estructura de las proteínas.....	59
2.9.3.2 Efecto de la temperatura en la estructura de las proteínas.	61
2.9.3.3 Efecto combinado de P/T sobre la estructura de las proteínas	61
2.9.4 Diferencias entre las técnicas de hidrólisis.....	63
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
<b>3.1 OBTENCIÓN DE SANGRE.....</b>	<b>67</b>
<b>3.2 SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES LÍQUIDA Y SÓLIDA.</b>	<b>68</b>
<b>3.3 FRACCIONAMIENTO DEL PLASMA.....</b>	<b>68</b>
<b>3.4 PURIFICACIÓN DE LA HEMOGLOBINA.....</b>	<b>71</b>
3.4.1 Globina precipitada.....	71
3.4.1.1 Globina precipitada coloreada.....	72
3.4.1.2 Globina precipitada decolorada.....	72
<b>3.5 CONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS CON DEXTRANO.....</b>	<b>73</b>
<b>3.6 HIDRÓLISIS DE HEMOGLOBINA.....</b>	<b>73</b>
3.6.1 Hidrólisis química.....	74
3.6.2 Eliminación de sales.....	76

3.6.3	Hidrólisis a altas temperaturas y presión moderada en atmosfera controlada.....	77
<b>3.7</b>	<b>MÉTODOS ANALÍTICOS.....</b>	<b>80</b>
3.7.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	80
3.7.2	Medida de las propiedades funcionales.....	80
3.7.2.1	Método de Lowry.....	81
3.7.2.2	Determinación de la solubilidad.....	82
3.7.2.3	Determinación de las propiedades emulsificantes.....	83
3.7.2.4	Determinación de las propiedades espumantes.....	83
3.7.2.5	Concentración mínima de gelificación (LGC).....	84
3.7.2.6	Temperatura de gelificación.....	84
3.7.2.7	Color de los hidrolizados.....	85
3.7.3	Nivel de conjugación proteína/dextrano.....	86
3.7.4	DSC: calorimetría diferencial de barrido.....	86
3.7.5	IMC: microcalorimetría isoterma.....	86
3.7.6	Medida de las propiedades antioxidantes.....	87
3.7.6.1	Poder reductor.....	87
3.7.6.2	Capacidad de captura del radical hidroxilo.....	88
3.7.6.3	Poder quelante del ion ferroso.....	88
3.7.7	Análisis de los productos de la hidrólisis.....	89
3.7.7.1	Análisis cuantitativo de aminoácidos.....	90
3.7.7.2	Análisis de productos no solubles.....	90
3.7.7.3	Análisis de productos solubles.....	91
3.7.7.4	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	94
3.7.7.5	Cuantificación de compuestos amoniacaes.....	95



<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	97
<b>4.1 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS NATIVAS</b> .....	99
4.1.1 Solubilidad.....	100
4.1.2 Capacidad de emulsificación.....	101
4.1.3 Capacidad espumante.....	106
4.1.4 Propiedades gelificantes.....	108
4.1.5 Comparación y aplicabilidad de las propiedades funcionales...	111
<b>4.2 CONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS CON DEXTRANO</b> .....	115
4.2.1 Efecto de la temperatura en la conjugación.....	115
4.2.2 Análisis electroforético de los conjugados.....	119
4.2.3 Propiedades funcionales de los conjugados.....	122
4.2.3.1 Solubilidad.....	122
4.2.3.2 Estabilidad térmica.....	124
4.2.3.3 Propiedades gelificantes.....	127
4.2.3.4 Análisis DSC.....	129
4.2.3.5 Capacidad emulsificante.....	130
4.2.3.6 Resultados IMC.....	132
4.2.3.7 Aplicaciones alimentarias de los conjugados.....	134
<b>4.3 HIDRÓLISIS QUÍMICA ÁCIDA DE HEMOGLOBINA</b> .....	136
4.3.1 Efecto de la temperatura.....	136
4.3.2 Análisis de las fracciones.....	138
4.3.2.1 Cuantificación de aminoácidos (Aa).....	138
4.3.2.2 Cuantificación de proteína no soluble (NSP).....	139
4.3.2.3 Cuantificación de péptidos solubles (SP).....	141

4.3.2.4 Evolución del peso molecular de SP.....	145
4.3.3 Modelo cinético de la hidrólisis ácida de hemoglobina.....	147
<b>4.4 HIDRÓLISIS QUÍMICA BÁSICA DE HEMOGLOBINA.....</b>	<b>154</b>
4.4.1 Análisis de las fracciones.....	154
4.4.1.1 Cuantificación de Aa.....	155
4.4.1.2 Cuantificación de NSP.....	157
4.4.1.3 Análisis cuantitativo de la fracción soluble.....	158
4.4.1.4 Evolución del tamaño de los péptidos solubles.....	161
4.4.2 Modelo cinético de la hidrólisis química básica.....	164
4.4.3 Neutralización y eliminación de sales.....	169
<b>4.5 HIDRÓLISIS EN ATMÓSFERA OXIDANTE Y</b>	
<b>REDUCTORA.....</b>	<b>172</b>
4.5.1 Influencia de la temperatura de hidrólisis en el tamaño de los péptidos y en el rendimiento, bajo atmósfera de nitrógeno....	174
4.5.2 Influencia de la temperatura de hidrólisis en el tamaño de los péptidos y en el rendimiento, bajo atmósfera de oxígeno.....	178
4.5.3 Influencia de la temperatura y la presión en el proceso de hidrólisis.....	183
4.5.4 Análisis de los perfiles cromatográficos.....	184
4.5.5 Cuantificación de aminoácidos y compuestos de amonio.....	190
4.5.6 Propiedades funcionales.....	194
4.5.7 Eficacia de decoloración de la hidrólisis física.....	198
4.5.8 Neutralización del radical hidroxilo.....	200
4.5.9 Poder reductor.....	202
4.5.10 Capacidad de quelar el ion ferroso.....	203

4.5.11 Diferencias entre los péptidos obtenidos bajo diferentes atmósferas.....	205
<b>4.6 ESQUEMA DEL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA SANGRE.....</b>	<b>207</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>211</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>217</b>
<b>7. PUBLICACIONES.....</b>	<b>235</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>239</b>

## **Lista de figuras**

	<u>página</u>
<i>Figura 1. Estructura general de los aminoácidos comunes.</i>	15
<i>Figura 2. Fundamento químico de la formación de un enlace peptídico.</i>	17
<i>Figura 3. Estructura tridimensional de la hemoglobina, con los grupos hemo señalados mediante flechas (izquierda). Estructura química de cada uno de los grupos hemo que constituyen la hemoglobina (derecha).</i>	29
<i>Figura 4. Esquema de las dos fases de una emulsión.</i>	34
<i>Figura 5. Cadena de reacciones que tienen lugar durante la reacción de Maillard y posterior reordenamiento de Amadori. Finalmente se forma el aldehído de Strecker.</i>	44
<i>Figura 6. Formación e hidrólisis de un enlace peptídico.</i>	55
<i>Figura 7. Representación esquemática del diagrama de fases elíptico de las proteínas. Las flechas marcadas con las letras h, c y p muestran las vías específicas de desnaturalización conocidas por presión, calor y congelación.</i>	62
<i>Figura 8. Diagrama de flujo para el fraccionamiento del plasma de cerdo.</i>	70
<i>Figura 9. Reactor empleado para la hidrólisis química.</i>	75
<i>Figura 10. Esquema del reactor empleado en la hidrólisis física de hemoglobina.</i>	79
<i>Figura 11. Fracciones encontradas en el medio después de la hidrólisis química y física.</i>	89
<i>Figura 12. Cromatograma de los péptidos solubles obtenidos por hidrólisis química. Las líneas azules representan los tiempos de elución correspondientes a 60, 50, 40, 30, 20, 10 y 6 kDa.</i>	93
<i>Figura 13. Efecto del pH en la solubilidad de las proteínas del plasma (Fibrinógeno, Albumina porcina, (<math>\alpha</math> y <math>\beta</math>)-Globulinas y <math>\gamma</math>-Globulinas) y en el plasma sin fraccionar.</i>	101
<i>Figura 14. Efecto del pH del medio en la solubilidad de proteínas celulares. Hemoglobina, globina coloreada y globina decolorada.</i>	103
<i>Figura 15. Capacidad de emulsificación de proteínas del plasma. Fibrinógeno, albúmina porcina, <math>\gamma</math>-Globulinas, (<math>\alpha</math> y <math>\beta</math>) Globulinas, y</i>	104

plasma completo.

<i>Figura 16. Capacidad de emulsificación de las proteínas celulares. Hemoglobina, globina coloreada y globina decolorada.</i>	106
<i>Figura 17. Efecto del pH en la capacidad espumante de las proteínas del plasma (albúmina porcina, <math>\gamma</math>-Globulinas, (<math>\alpha</math> y <math>\beta</math>)-Globulinas, y fibrinógeno) y en el plasma completo.</i>	108
<i>Figura 18. Efecto del pH en la capacidad espumante de proteínas celulares. Globina coloreada, y hemoglobina.</i>	108
<i>Figura 19. Evolución de la concentración de los grupos amino libres presentes en las fracciones FII, FIII, FIV y hemoglobina durante el tiempo de ensayo en función de la temperatura.</i>	116
<i>Figura 20. Electroforesis de la evolución de la conjugación de la fracción FIII a 80 °C.</i>	120
<i>Figura 21. Electroforesis de la evolución del tamaño molecular de la hemoglobina durante la conjugación a diferentes temperaturas.</i>	121
<i>Figura 22. Solubilidad de las fracciones plasmáticas FII, FII y FIV y de la hemoglobina antes y después de la conjugación.</i>	123
<i>Figura 23. Estabilidad térmica de las proteínas nativas (colores lisos) y conjugadas (colores rayados) a pH 4 y 7, tras ser sometidas a tratamiento térmico (80°C, 15 min).</i>	125
<i>Figura 24. Capacidad emulsificante de proteínas nativas y conjugadas, empleando 4mg/ml de proteína (colores lisos) y 10 mg/ml de proteína (colores rayados).</i>	131
<i>Figura 25. Variación de energía libre del sistema durante el proceso de conjugación de hemoglobina y dextrano a 60 °C.</i>	133
<i>Figura 26. Evolución del tamaño medio de los péptidos obtenidos con HCl 6 M a diferentes temperaturas: 50 °C y 80°C.</i>	137
<i>Figura 27. Cromatograma de la fracción de péptidos solubles obtenidos tras 6 horas de hidrólisis con ácidos sulfúrico 6 M.</i>	142
<i>Figura 28. Evolución de la composición de la fracción SP en función del tamaño de los péptidos que la forman.</i>	146
<i>Figura 29. Rutas de las reacciones que tienen lugar durante la hidrólisis ácida de la hemoglobina.</i>	148



<i>Figura 30. Valores experimentales de abundancia relativa de las fracciones estudiadas (símbolos) y valores obtenidos con el modelo informáticos (líneas discontinuas) para hidrólisis con ácido sulfúrico 6M (A) y ácido clorhídrico 6 M (B) a 50 °C.</i>	152
<i>Figura 31. . Evolución de las fracciones hemoglobina, NSP, SP y Aa bajo diferentes concentraciones de sosa. A: 9M, B: 6M y C: 3M.</i>	155
<i>Figura 32. Evolución del tamaño medio de los péptidos con el tiempo bajo diferentes concentraciones de sosa.</i>	162
<i>Figura 33. Evolución en la concentración de hemoglobina y péptidos de diferente tamaño durante la hidrólisis básica 6M.</i>	163
<i>Figura 34. Rutas de las reacciones que tienen lugar durante la hidrólisis alcalina de la hemoglobina.</i>	164
<i>Figura 35. Comparación entre los datos experimentales y los datos obtenidos en la simulación de las hidrólisis básicas</i>	168
<i>Figura 36. Rendimiento del proceso de hidrólisis y evolución del tamaño medio de los péptidos con el tiempo, cuando se trabaja con atmósfera de nitrógeno a diferentes temperaturas.</i>	176
<i>Figura 37. Rendimiento del proceso de hidrólisis y evolución del tamaño medio de los péptidos con el tiempo, cuando se trabaja con atmósfera de oxígeno a diferentes temperaturas.</i>	182
<i>Figura 38. Perfiles cromatográficos obtenidos a diferentes tiempos bajo diferentes condiciones de temperatura y de atmósfera. Derecha con nitrógeno, izquierda con oxígeno.</i>	185
<i>Figura 39. Solubilidad de la hemoglobina nativa, de los péptidos obtenidos con atmósfera de nitrógeno (PN<sub>2</sub>) y de oxígeno (PO<sub>2</sub>) en función del pH.</i>	195
<i>Figura 40. Capacidad de emulsificación de la hemoglobina nativa, de los péptidos obtenidos con nitrógeno (PN<sub>2</sub>) y con oxígeno (PO<sub>2</sub>) en función de la concentración de proteína.</i>	195
<i>Figura 41. Evolución del color de una disolución de hemoglobina (50 mg/ml) durante la hidrólisis con atmósfera de oxígeno.</i>	200
<i>Figura 42. Efecto captura del radical hidroxilo por hemoglobina nativa, ácido ascórbico y péptidos obtenidos con atmósfera de nitrógeno y oxígeno.</i>	201
<i>Figura 43. Poder reductor de la hemoglobina nativa, de los péptidos obtenidos con atmósfera de nitrógeno y oxígeno, en función de su concentración.</i>	203

<i>Figura 44. Capacidad quelante del ion ferroso por parte del EDTA, hemoglobina nativa y péptidos obtenidos bajo atmósfera de nitrógeno y oxígeno.</i>	204
<i>Figura 45. Diagrama de flujo del aprovechamiento integral de la sangre aplicando las técnicas desarrolladas en el presente trabajo.</i>	208
<i>Figura 46: Fracciones del plasma nativas y conjugadas. FI (A), FII (B), FIII (C), FIV (D), FII conjugada (E), FIII conjugada (F) y FIV conjugada (G).</i>	209
<i>Figura 47. Hemoglobina liofilizada (A), hemoglobina conjugada con dextrano (B), globina coloreada (C), globina decolorada (D), péptidos obtenidos mediante hidrólisis física con inyección de oxígeno (E) y nitrógeno (F).</i>	210

## **Lista de tablas**

	<u>página</u>
<i>Tabla 1. Número de cabezas de ganado sacrificadas en los últimos 7 años en España.</i>	4
<i>Tabla 2. Sacrificios diarios en un matadero de gran tamaño en Asturias. Datos correspondientes al matadero Central de Asturias (Junquera-Bobes, Noreña, Asturias) del año 2005.</i>	6
<i>Tabla 3. Composición de la sangre.</i>	8
<i>Tabla 4. Composición química del plasma bovino.</i>	25
<i>Tabla 5. Porcentaje de las distintas fracciones proteicas del plasma bovino.</i>	26
<i>Tabla 6. Composición de las células rojas.</i>	27
<i>Tabla 7. Principales parámetros físicos de las proteínas plasmáticas.</i>	28
<i>Tabla 8. Propiedades funcionales que intervienen en diversos alimentos.</i>	41
<i>Tabla 9. Comparación entre hidrólisis química, física y enzimática.</i>	64
<i>Tabla 10. Medios de hidrólisis química empleados.</i>	74
<i>Tabla 11. Absorbancia según la concentración y el tipo de muestra.</i>	92
<i>Tabla 12. Contenido en sólidos totales y en proteína de las fracciones plasmáticas.</i>	99
<i>Tabla 13. <math>T_{gel}</math> en disoluciones de proteínas al 10% (p/v) a pH 6 y concentración mínima de gelificación (LGC) para dichas proteínas.</i>	109
<i>Tabla 14. Valores promedio de volumen de espuma, solubilidad, capacidad de emulsificación y LGC de proteínas sanguíneas a pH de valor intermedios.</i>	112
<i>Tabla 15. Evolución de la solubilidad y de la capacidad emulsionante de las proteínas sanguíneas con respecto a su pl.</i>	113
<i>Tabla 16. Aplicaciones de las diferentes proteínas sanguíneas según sus propiedades funcionales.</i>	114
<i>Tabla 17. Grupos amino libres (expresados mM equivalentes de leucina) detectados en proteínas nativas (inicial) y conjugadas (final).</i>	118
<i>Tabla 18. Propiedades gelificantes de las proteínas nativas y conjugadas.</i>	127

<i>Tabla 19. Variación de la temperatura de transición en proteínas conjugadas.</i>	130
<i>Tabla 20. Aplicaciones de las proteínas modificadas en la industria alimentaria.</i>	135
<i>Tabla 21. Evolución de los NSP durante la hidrólisis bajo diferentes tratamientos ácidos.</i>	140
<i>Tabla 22. Evolución de la cantidad de péptidos solubles (SP) durante el tiempo de hidrólisis. La cantidad inicial de hemoglobina es de 50 mg/mL.</i>	143
<i>Tabla 23. Composición según su tamaño de los péptidos obtenidos tras 24 horas de hidrólisis bajo diferentes medios.</i>	144
<i>Tabla 24. Abundancia relativa de las cuatro fracciones obtenidas durante la hidrólisis ácida de la hemoglobina a 50 °C empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6M y HCl 6M.</i>	147
<i>Tabla 25. Valores de las constantes cinéticas (k<sub>x</sub>) obtenidas para la hidrólisis con Hcl 6M y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6M., basado en el modelo cinético propuesto. Los valores están expresados en h<sup>-1</sup>.</i>	150
<i>Tabla 26. Cantidad de aminoácidos producidos durante el proceso de hidrólisis a diferentes concentraciones de sosa. Se expresan como porcentaje de la cantidad inicial de hemoglobina.</i>	156
<i>Tabla 27. Porcentaje de hemoglobina transformada en NSP a diferentes tiempos y concentraciones de sosa.</i>	157
<i>Tabla 28. Porcentaje de hemoglobina que permanece soluble y sin hidrolizar a lo largo del proceso de hidrólisis básica.</i>	159
<i>Tabla 29. Concentración de péptidos solubles a lo largo de la hidrólisis básica, expresados como porcentaje de la cantidad inicial de hemoglobina.</i>	159
<i>Tabla 30. Porcentaje de cada fracción detectada durante la hidrólisis básica a diferentes concentraciones de sosa.</i>	166
<i>Tabla 31. Valor de las constantes cinéticas calculadas para cada una de las concentraciones de sosa empleadas. Los parámetros kb/kb' y kc/kc' son mostrados. Valores expresados en h<sup>-1</sup>.</i>	167
<i>Tabla 32. Efecto de las hidrólisis químicas en los diferentes aminoácidos.</i>	170
<i>Tabla 33. Concentración de péptidos solubles según su tamaño, dado como porcentaje de la cantidad inicial de hemoglobina, obtenidos a diferentes temperaturas, en atmósfera de nitrógeno.</i>	175

<i>Tabla 34. Concentración de péptidos solubles según su tamaño, dado como porcentaje de la cantidad inicial de hemoglobina, obtenidos a diferentes temperaturas, en atmósfera de oxígeno.</i>	179
<i>Tabla 35. Principales picos detectados en hidrólisis en las que nitrógeno es inyectado a diferentes temperaturas.</i>	187
<i>Tabla 36. Principales picos detectados en hidrólisis en las que oxígeno es inyectado a diferentes temperaturas.</i>	187
<i>Tabla 37. Cantidad total de aminoácidos y de compuestos de amoniac (CA) detectados, dentro del reactor y en el borboteador, durante el proceso a diferentes temperaturas con atmósfera de nitrógeno. Cantidades expresadas en mg.</i>	191
<i>Tabla 38. Cantidad total de aminoácidos y de compuestos de amoniac (CA) detectados, dentro del reactor y en el borboteador, durante el proceso a diferentes temperaturas con atmósfera de oxígeno. Cantidades expresadas en mg.</i>	192
<i>Tabla 39. Valores de tamaño medio molecular, propiedades funcionales y antioxidantes de los péptidos según su modo de producción.</i>	205



## AGRADECIMIENTOS

Estas son las últimas palabras que he escrito en toda esta memoria. No quería dejar de nombrar a ninguna de las personas que a lo largo de estos años me han ofrecido su amistad y compañerismo, y para los que no hay *negro sobre blanco* que pueda reflejar de ninguna manera lo realmente agradecido y orgulloso que me siento de haberlos conocido. Parafraseando otra tesis: “solo espero ser merecedor de todo el cariño y apoyo recibido durante todo este tiempo”.

En primer lugar a Mario Díaz que, desde mi inicio en el departamento, me ha ayudado y guiado en todo momento en que lo he necesitado. Llegándome a hablar como a un hijo para aconsejarme y darme apoyo.

A Manuel Rendueles, tengo demasiadas cosas que agradecerle, pero sobre todo su enorme implicación con este proyecto. Ha sido el entrenador de esta carrera de fondo, ayudándome a superar todos los baches que la carretera presentaba.

He de agradecer a los grupos de Emulsiones, Separación por Membranas y Reactores de este departamento su desinteresada ayuda en algunas fases de este trabajo; así como a Beatriz y Arantxa, del servicio de Ensayos Térmicos y Análisis Elemental. Al matadero de Junquera-Bobes, que siempre me han ayudado de muy buen grado a recolectar el oro rojo.

Mis primeros pasos en el laboratorio estuvieron guiados por Mónica Herrero que fue la mejor cicerone que pude tener, y Luis Arsenio que sacaba mi lado revolucionario e inconformista en charlas de autobús.

A mis abuelos, Aurelia y Tino, que allá donde estén jugando su partida de cartas sepan que no los olvido. A Rufino y María, que cada día puntualmente a las 9 de la noche me hacen saber que me quieren.

A mis padres, que lo han dado todo por mi hermana y por mí, sin dejarse nada. Siempre nos han ofrecido lo mejor, empezando el día de la caída del columpio, pasando por los “cequetines” y llegando hasta el día de hoy, todo su amor.

Mi hermana siempre ha estado ahí, desde que tengo memoria (es mayor que yo) y cada año que pasa le tengo más y más cosas que agradecer.

A mi pequeñina, porque desde ese día en que estaba sentado en una escalera y te vi pasar has hecho de mi vida la mejor posible. Aún nos quedan miles de sitios a los que viajar, miles de películas que ver y sobre todo, tenemos que descubrir el nombre del viento.

Para mis amigos de toda la vida, de los que puedo presumir de conocer hace décadas y de saber que sólo una llamada de distancia nos separa. Por interesarse en mi trabajo mientras jugamos a los dardos o hacemos la plaza.

En estos años han pasado muchos compañeros por el laboratorio, de todos ellos he aprendido algo. La hermandad del Grinch (Este, Lore y Covi), Ainoa, Bea y Bea, Sergio, Saúl, Ismael, Pilar, Patricia, Irene, Paula, Fede, Vanesa, Marta, Kike Dee, Manuel, Laura, Inés, César, Janire, Rosana, Manu, Amanda, Emilio, Daniel, Ayoa, Violeta... Espero me perdonéis por no dedicaros todas las líneas que os merecéis, por haceros escuchar cientos de canciones en el laboratorio y por las gotitas rojas...

Gracias a todos.

## RESUMEN

En el presente trabajo se plantea la revalorización de la sangre de porcino procedente de macelos asturianos mediante la recuperación de sus proteínas. Esta recuperación se hace con un doble objetivo: por un lado reducir el volumen de vertido de este subproducto con una alta carga orgánica contaminante, y por otro producir derivados de la sangre con un alto valor añadido mediante el desarrollo de métodos adecuados. El trabajo se ha estructurado en tres etapas: en la primera se ha trabajado en la separación y purificación de las proteínas presentes originalmente en la sangre y en su evaluación como ingredientes alimentarios en función de sus propiedades funcionales. En las dos etapas siguientes se desarrollaron métodos de modificación de dichas proteínas con el fin de mejorar sus propiedades (conjugación con dextrano) o bien en producir hidrolizados mediante hidrólisis química o hidrólisis física.

En primer término, la sangre ha sido recogida y separada en sus dos componentes principales: fracción plasmática y fracción celular. El plasma ha sido a su vez fraccionado siguiendo una variación del método de Cohn, con lo que se consiguieron cuatro fracciones plasmáticas: FI (compuesta principalmente por fibrinógeno), FII (formada casi al completo por  $\gamma$ -globulinas), FIII (cuyas principales proteínas son  $\alpha$  y  $\beta$ -globulinas) y FIV (formada mayoritariamente por albúmina). De la fracción celular se ha extraído y purificado la hemoglobina, la proteína más abundante de la sangre, que se puede transformar en otros subproductos como globina precipitada y globina decolorada precipitada.

Con el objetivo de evaluar la aplicación de las proteínas plasmáticas y celulares a la industria alimentaria se analizaron diferentes propiedades funcionales (solubilidad, emulsificación, gelificación, espumación) en todas las fracciones proteicas obtenidas. De este modo, en función del valor obtenido para dichas propiedades, se puede decidir qué tipo de alimentos se pueden suplementar con cada proteína.

En la segunda parte de este trabajo y buscando ampliar el rango de aplicación de las proteínas nativas, se modificó su estructura a través de la reacción de Maillard, empleando dextrano de 10kDa. De este modo se consiguió mejorar la

estabilidad térmica, la capacidad emulsionante y modificar las temperaturas de gelificación de todas las proteínas conjugadas. Con estos cambios, se consiguió aumentar el rango de aplicabilidad de las proteínas sanguíneas a la industria alimentaria.

En la última parte del presente trabajo se evaluaron diferentes métodos para producir hidrolizados de hemoglobina porcina purificada. Para ello se emplearon métodos químicos (usando diversas concentraciones de HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o NaOH) y métodos físicos (presión de 4 MPa, temperaturas entre 120 y 180°C y atmósfera de oxígeno o nitrógeno). Las diferentes variables de operación fueron evaluadas para cada método en función de diversos parámetros, como el rendimiento de conversión de hemoglobina en péptidos, el tamaño final de los mismos y las propiedades funcionales y antioxidantes de cada uno de ellos. Este trabajo muestra como los métodos químicos tienen un rendimiento moderado de producción de péptidos, la mayoría de los cuales tienen un alto peso molecular. Por otro lado, los métodos físicos tienen un mayor rendimiento de producción de péptidos, originando péptidos de bajo peso molecular que presentaban unas buenas propiedades antioxidantes y funcionales.

Por tanto, en función del tipo de tratamiento utilizado (reacción de Maillar, hidrólisis química o hidrólisis física) y de las condiciones de operación del mismo, es posible emplear la sangre, considerada como un residuo en los mataderos, para conseguir un amplio rango de productos de diferentes propiedades que puedan ser aplicados en multitud de productos de alimentación.

## ABSTRACT

The present work deals with the revaluation of porcine blood by the recovery of its proteins. This recovery is done with two objectives: firstly to reduce the volume of waste of this product highly pollutant and other produce blood derivates with added value by developing appropriate methods. The work is structured in three stages: first stage was the purification of proteins present in the blood and its evaluation as food ingredients based on their functional properties. In the following two steps several methods were developed to modify these proteins in order to improve their properties (conjugation with dextran) or to produce haemoglobin hydrolysates through chemical or physical hydrolysis.

First, the blood was collected and separated into its two major components: plasma and cellular fraction. The plasma was fractionated following a variation of the method of Cohn, which were obtained four plasma fractions: FI (mainly composed of fibrinogen), FII (consisting almost entirely by  $\gamma$ -globulins), FIII (whose major proteins are  $\alpha$  and  $\beta$ -globulins) and FIV (comprised mostly of albumin). From cell fraction haemoglobin was extracted and purified, the most abundant protein in the blood, which can be transformed into other products such as precipitated globin and discolored precipitated globin.

In order to evaluate the application of plasma proteins and haemoglobin to the food industry were analyzed different functional properties (solubility, emulsifying, gelling, foaming). Thus, according to the value obtained for these properties, it is possible to decide what kind of foods can be supplemented with each protein.

In the second part of this work and looking to expand the application range of the native proteins; their structure was modified through the Maillard reaction using



dextran of 10kDa. An improving in the thermal stability and emulsifying capacity was achieved; besides the gelling temperature was notably increased. With these changes, the range of applicability of the blood proteins in the food industry was enhanced.

In the last part of this work were evaluated different methods for producing purified porcine haemoglobin hydrolysates. It was employed chemical hydrolysis (using various concentrations of HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, or NaOH) and physical methods (pressure of 4 MPa, temperatures between 120 and 180 ° C and atmospheric oxygen or nitrogen). The different operating variables were evaluated for each method based on various parameters such as the conversion yield of hemoglobin into peptides, their final size and functional properties and antioxidants of the peptides. This work shows how chemical methods have a moderate yield producing peptides, which are high molecular weight. On the other hand, physical methods have a higher yield of peptides, forming low molecular weight peptides that showed good antioxidant properties and functional.

Therefore, depending on the type of treatment used (Maillard's reaction, physical or chemical hydrolysis) and the operating conditions of each treatment, it is possible to use blood, considered as a waste in slaughterhouses, to create a wide range of products with different properties that can be applied in many food products.

## *1.- Introducción*



## 1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas ambientales más graves hoy en día es la generación de residuos en todos los niveles de la sociedad, con un incremento paulatino e imparable debido, entre otras cosas, a la mejora de nuestra calidad de vida y a un nivel industrialización cada vez mayor. Una mala gestión de los residuos que se generan puede derivar en la contaminación de suelos y aguas o en la emisión de sustancias tóxicas, lo que puede representar un problema grave para la salud pública.

En numerosas Directivas y demás actos jurídicos de la CEE de los últimos años, está latente la triple filosofía de reducir materia prima, reciclar y reutilizar. Concretamente, en la Directiva 2008/98/CE se refuerza la política de prevención y se promociona la reutilización y el reciclaje, definiéndose por primera vez la diferencia entre residuos y subproducto. Así, un subproducto es cualquier *sustancia u objeto, resultante de un proceso de producción, cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto, que se diferencia de un residuo en que un subproducto*

*a) va a ser utilizado ulteriormente;*

*b) puede utilizarse directamente sin tener que someterse a una transformación ulterior distinta de la práctica industrial normal;*

*c) objeto se produce como parte integrante de un proceso de producción; y*

*d) el uso ulterior es legal, es decir la sustancia u objeto cumple todos los requisitos pertinentes para la aplicación específica relativos a los productos y a la protección del medio ambiente y de la salud, y no producirá impactos generales adversos para el medio ambiente o la salud humana.*

Además, la Unión Europea ha propuesto una jerarquía de gestión de residuos que se basa en la reducción de residuos en origen y en dar el mejor uso posible a los

residuos generados. El primer lugar de esta jerarquía lo ocupan las medidas que evitan la generación de residuos, seguidas por el fomento de su reutilización, reciclado, valorización y, finalmente, por la optimización de los métodos de eliminación definitiva de los residuos no valorizados.

En esta línea, en la industria alimentaria actual existe la tendencia a la reducción de residuos y la revalorización de los mismos, buscando por un lado las ventajas medioambientales que esto ocasiona y, por otro, la disminución de los costes asociados a la producción. Una de las industrias donde el volumen de residuos y subproductos es particularmente importante es la cárnica, ya que genera gran cantidad de sustancias que pueden y han de ser aprovechadas. Como muestra la Tabla 1, en la que se recoge el número de animales sacrificados durante los últimos años en España. Lo que nos da una idea de la cantidad de residuos generados por esta actividad

*Tabla 1. Número de cabezas de ganado sacrificadas en los últimos 7 años en España.*

Clase de ganado	Total cabezas sacrificadas / año (en miles)						
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<b>Bovino</b>	3.732	2.758	2.599	2.428	2.507	2.307	2.226
<b>Equino</b>	25	28	28	26	31	30	31
<b>Ovino</b>	20.214	19.391	18.623	17.062	12.556	11.393	11.173
<b>Aves</b>	692.398	690.855	669.010	694.891	675.446	675.466	692.163
<b>Caprino</b>	1.604	1.581	1.518	1.358	1.155	1.173	1.158
<b>Conejos</b>	62.317	61.049	61.618	61.848	51.435	51.330	51.308
<b>Porcino</b>	37.835	38.705	39.277	41.489	41.396	40.118	40.144

A la vista de la tabla se puede concluir que la preponderancia de los sacrificios de animales está encabezada por el porcino (61%), seguido por el ovino (21%), bovino (16%), equino (1%) y caprino (1%). Dependiendo del tipo de animal sacrificado, el rendimiento está entre un 50 y un 80%, es decir, puede darse el caso de que un 50% del peso total del animal vivo no sea aprovechado; lo que, unido al elevado número de animales sacrificados, implica un volumen muy elevado de residuos producidos. El estiércol, purín en la etapa de recepción y estabulación, la sangre, y los lodos de depuradora (difíciles de gestionar debido a su elevada humedad y su alta putrescibilidad), junto con los cuerpos enteros, partes del animal o productos de origen animal no destinados al consumo humano, son los principales residuos orgánicos generados en los mataderos.

Estos residuos se clasifican en tres tipos, en función de su peligrosidad, según el Reglamento (CE) 1774/2002:

- Tipo 1: cualquier material que proceda de un animal infectado, o que pueda ser sospechoso de serlo, por un EET (encefalopatía espongiforme transmisible) o que haya estado en contacto con estos residuos.
- Tipo 2: residuos procedentes del tracto digestivo y el estiércol; o de animales con presencia de medicamentos o animales que mueran por causas diferentes al sacrificio para consumo humano.
- Tipo 3: partes de animales sacrificados aptos para el consumo humano, que no presenten síntomas de EET, y sangre procedente de animales que no sean rumiantes sacrificados en un matadero y tras haber sido sometidos a una inspección ante mortem y que a resultas de dicha inspección sean declarados aptos para el sacrificio con vistas al consumo humano de conformidad con la normativa comunitaria.

Cada tipo de material debe ser tratado de manera acorde a su clasificación. Además, todo material clasificado como de Tipo 1 ha de ser considerado como un producto y no un subproducto.

Entre los subproductos de Tipo 3 (o no peligrosos), que genera la industria cárnica uno de los más problemáticos, por el elevado volumen producido y por su poder contaminante, es la sangre<sup>95</sup>. En términos de DQO, un litro de sangre necesita aproximadamente 400.000 mg de O<sub>2</sub><sup>5</sup> para su total degradación, además de poseer más de un 18 a un 20% de sólidos. El problema medioambiental que esto ocasiona es muy grave. Evidentemente, el volumen de sangre que se genera a diario en un matadero depende del número y tipo de cabezas de ganado que se sacrifique, siendo el contenido medio en sangre de un animal el 7% de su peso. En la Tabla 2 se puede observar la cantidad de residuos generados en un día de actividad en un matadero local de tamaño medio situado en Noreña, Asturias. Se ha seleccionado este matadero por ser un reflejo de la actividad que se desempeña en la mayoría de los mataderos del Principado de Asturias.

*Tabla 2. Sacrificios diarios en un matadero de gran tamaño en Asturias. Datos correspondientes al matadero Central de Asturias (Junquera-Bobes, Noreña, Asturias) del año 2005.*

	<b>Animales sacrificados</b>	<b>Volumen de sangre por animal</b>	<b>Volumen total de sangre</b>
<b>Bovino</b>	100	18 L	1.8 m <sup>3</sup>
<b>Porcino</b>	800	4 L	3.2 m <sup>3</sup>
	<b>TOTAL</b>		<b>5 m<sup>3</sup></b>

De esta sangre generada mediante el sacrificio solamente se utiliza para elaboración industrial el 15-20% de la misma, principalmente para la elaboración de morcillas<sup>47</sup>. En el matadero usado como ejemplo, donde se trabaja unas 250 jornadas al año, se producen anualmente unas 1.313 toneladas de sangre, de las cuales solo unas 250 son empleadas con esa finalidad.

Teniendo en cuenta que el sector cárnico se encuentra entre los cinco primeros sectores industriales españoles y representa cerca del 20% de todo el sector alimentario, es fácil darse cuenta de la ingente cantidad de residuos altamente contaminantes generados y de la necesidad de su recuperación y reutilización.

La legislación cada vez es más exigente (Real Decreto 509/1996) y desde hace unos años obliga a la depuración de estos desechos previamente a su vertido. Pero los equipos de depuración de las aguas residuales de los mataderos se ven enormemente perjudicados en su funcionamiento si el contenido total de sangre se vierte directamente a la depuradora, de hecho las depuradoras no funcionan correctamente con efluentes cuyo contenido en sangre sea superior al 5%. Por tanto, si se envía la sangre directamente a la depuradora, se perjudica en primer lugar al equipo de depuración y también se degrada la calidad de las aguas residuales que se vierten, bien a cauces públicos, o a redes de alcantarillado. Relacionado con este problema de la depuración, la legislación medioambiental de la Unión Europea prohíbe el vertido a los digestores por sobrecarga y obliga a partir de 1996 al aprovechamiento de la sangre para fines diversos (Directiva 96/61/CE).

Cabe señalar que la problemática de la sangre generada en los mataderos es un problema que viene estudiándose desde hace años, de modo que a día de hoy existen varias tecnologías aplicables al aprovechamiento integral de la sangre y sus



componentes, para obtener productos tales como sangre en polvo, sangre soluble entera, plasma en polvo<sup>34, 35, 78, 79</sup>, etc. Todos estos son productos de bajo valor añadido, pero útiles en diversas aplicaciones tales como complemento en alimentación animal o humana y que permiten el aprovechamiento de grandes volúmenes de sangre. Sin embargo, ninguna de estas tecnologías presta especial interés al aprovechamiento de las proteínas contenidas en la sangre. Analizando la composición de la sangre (Tabla 3) se observa que después del agua el componente mayoritario son las proteínas con un 12-18%, lo que significa que por cada litro de sangre que se tira habrá entre 120 y 180 gramos de proteínas de elevado valor nutritivo que se pierden, cantidad que puede y debe ser recuperada. De este modo, no solo estaremos subsanando el problema de la contaminación sino que, a su vez, se obtendrá un producto revalorizado y comercializable<sup>128, 133</sup>.

*Tabla 3. Composición de la sangre*

<i><b>Parámetro</b></i>	<i><b>Porcentaje</b></i>
<i>Sólidos totales</i>	<i>18 - 20</i>
<i>Proteína</i>	<i>12 - 18</i>
<i>Grasa</i>	<i>&lt;1</i>
<i>Azúcares</i>	<i>&lt;1</i>
<i>Sales</i>	<i>2</i>
<i>Agua</i>	<i>80 - 82</i>

Con estas premisas parece lógico que se necesiten desarrollar tecnologías que permitan aprovechar la sangre como fuente de proteínas, permitiendo su recuperación y separación con un doble objetivo:

1º- disminuir la cantidad de residuos altamente contaminantes que se producen en la industria cárnica y que no son utilizados, y

2º- recuperar proteínas para su posterior uso en la industria.

La obtención de las proteínas de la sangre en diferentes escalas de producción y con diferentes purezas, permitiría ampliar su comercialización y salida al mercado, con lo que se rentabilizaría el tratamiento de residuos, gracias al elevado valor añadido del producto final. Por tanto, la valoración de esta materia orgánica responde al reto económico de obtener un valor añadido suplementario al procesamiento de la carne, aprovechando el alto contenido de los subproductos en proteínas y grasas.

Hasta el momento actual, se considera que las EET no afectan al ganado porcino, por tanto la normativa europea deroga la prohibición de su utilización a partir del 12 de junio del 2003 siempre que se evite su uso para alimentar animales de la misma especie, es decir, se prohíbe el canibalismo<sup>95</sup>. Teniendo en cuenta esta normativa y el hecho de que el volumen de sangre procedente del ganado porcino es superior, debido al mayor número de sacrificios, en el presente trabajo se ha optado por utilizar sangre procedente de porcino para su estudio y aprovechamiento.

El aprovechamiento integral de la sangre comienza con el tratamiento por separado de sus dos fracciones principales: fracción plasmática y fracción celular; y su posterior evaluación para su aplicación en la industria alimentaria. Cada una de ellas posee características diferentes y las técnicas empleadas para su aprovechamiento, por

tanto, difieren entre sí. La fracción celular está compuesta principalmente por glóbulos rojos, en cuyo interior se encuentra la hemoglobina, única proteína sanguínea de esta fracción. Por su lado, la fracción plasmática está compuesta por varias familias de proteínas que pueden ser separadas y, posteriormente, utilizadas en base a sus diferentes propiedades funcionales.

Las técnicas actuales de separación usando precipitación específica con etanol<sup>83</sup>, a partir de una modificación del método de Cohn<sup>28</sup>, permiten obtener cuatro fracciones proteicas del plasma. La primera de ellas está formada por fibrinógeno, la segunda por  $\beta$  y  $\gamma$ -globulinas, la tercera por  $\alpha$ -globulinas y una cuarta compuesta por albúmina. Posteriormente, a través de técnicas cromatográficas de intercambio iónico<sup>47</sup> se pueden obtener proteínas aisladas a partir de estas fracciones. Por último, la hemoglobina se puede obtener fácilmente a partir de la fracción celular con un elevado grado de pureza.

Una vez separadas las diferentes fracciones se consideró necesario realizar un estudio de sus propiedades funcionales: solubilidad, capacidad espumante, capacidad de emulsificación o propiedades gelificantes. Después del cual, se puede determinar el uso más adecuado de cada una de las proteínas basándonos en sus propiedades. Posteriormente, a través de la unión de las proteínas a hidratos de carbono, a través de la reacción de Maillard, se pueden modificar estas propiedades funcionales. El estudio de estas modificaciones y de los nuevos valores de las propiedades funcionales amplía el rango de aplicación de las proteínas, con lo cual las posibilidades de aprovechamiento y utilización se ven incrementadas.

Una de las principales aplicaciones de las proteínas recuperadas de la industria alimentaria es la producción de hidrolizados. Éstos se producen a través de la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas nativas, por diferentes mecanismos, para obtener

péptidos. De este modo se consigue aumentar la digestibilidad y pueden subsanarse problemas nutricionales de individuos que no pueden digerir proteínas; a la vez que se obtienen moléculas con capacidad antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, etc. El método de hidrólisis más habitual y extendido es el que emplea procesos enzimáticos, cuyas ventajas e inconvenientes con respecto a los métodos propuestos en este trabajo serán analizados y discutidos en las secciones siguientes.

En este trabajo se ha usado la hemoglobina para producir hidrolizados. Dentro de las diferentes proteínas que se encuentran en la sangre, se ha seleccionado la hemoglobina por dos motivos, por un lado por ser la proteína más abundante de la sangre y, por otro, la que más fácilmente se puede purificar, hecho que facilita los posteriores análisis y estudios. Además, se ha optado por utilizar métodos no enzimáticos, debido al alto costo que éstos presentan. Por ello, a lo largo de este trabajo se han usado métodos químicos (tanto ácidos y como alcalinos) o físicos (altas presiones y temperaturas bajo atmósferas controladas) para hidrolizar la hemoglobina y producir péptidos con diferentes propiedades según el método de producción.

### **Objetivos**

Así pues, teniendo en cuenta la problemática medioambiental originada por la producción de sangre, el estado de la técnica actual y la necesidad de buscar métodos de revalorizar las proteínas sanguíneas se han planteado un objetivo general. Éste consiste en la evaluación del aprovechamiento integral de la sangre de porcino, para convertir un subproducto de la industria cárnica en una amplia gama de productos de valor añadido de aplicación alimentaria. Por tanto, como objetivos específicos se plantea:

1. Evaluar las propiedades funcionales de las proteínas purificadas a partir de la fracción plasmática y celular de la sangre de porcino.
2. Estudiar las mejores condiciones de temperatura y tiempo para conjugar las fracciones proteicas con hidratos de carbono.
3. Comparar las propiedades funcionales de los conjugados obtenidos con respecto a las proteínas nativas.
4. Evaluar la aplicación de ácidos fuertes (sulfúrico y clorhídrico) para la obtención de hidrolizados a partir de hemoglobina purificada.
5. Extender el estudio a la aplicación de un álcali para la obtención de péptidos de hemoglobina.
6. Utilización de métodos físicos (presión y temperatura) para hidrolizar hemoglobina bajo dos diferentes atmósferas: oxígeno y nitrógeno.
7. Comparar la influencia de la atmósfera empleada en el perfil de peso molecular de los péptidos obtenidos.
8. Analizar y comparar las propiedades funcionales de los péptidos así obtenidos con respecto a la hemoglobina nativa.
9. Evaluar las propiedades antioxidantes que presentan estos péptidos en comparación con los obtenidos por medios enzimáticos.

## *2.- Fundamentos teóricos*



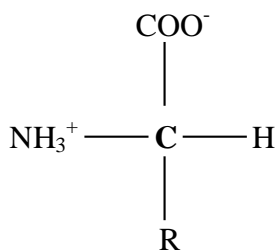
## 2.1 LAS PROTEÍNAS

Las proteínas cuyo nombre significa “el primer” o “en primer lugar” son las macromoléculas más abundantes en las células y constituyen casi la mitad del peso seco de la mayor parte de los organismos. Existen millares de clases diferentes de proteínas en la célula, cada una de las cuales lleva a cabo una función característica. Las proteínas no son solamente las macromoléculas más abundantes, sino que son extremadamente versátiles en sus funciones y aplicaciones como se irá viendo a lo largo de este trabajo.

### 2.1.1 Estructura

Todas las proteínas están constituidas por el mismo conjunto básico de 20 aminoácidos, que por sí mismos no tienen actividad biológica intrínseca. Las proteínas difieren unas de otras por su diferente secuencia de aminoácidos.

Los aminoácidos contienen, por lo menos un grupo amino primario (-NH<sub>2</sub>) y un grupo carboxílico (-COOH). En los aminoácidos derivados de las proteínas el grupo amino primario ocupa la posición  $\alpha$  con relación al grupo carboxílico. Los  $\alpha$ -aminoácidos naturales tienen la estructura que se muestra en la Figura 1.



*Figura 1. Estructura general de los aminoácidos comunes.*



Cada aminoácido tiene una cadena lateral característica R, que determina sus propiedades fisicoquímicas y por tanto las propiedades de la proteína que lo contiene.

Según la polaridad de esta cadena lateral se clasifican los aminoácidos en cuatro grupos:

- 1- Los aminoácidos con las cadenas laterales no polares o hidrófobos: Alanina (Ala), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Prolina (Pro), Triptófano (Trp), Valina (Val) son menos solubles en el agua que los aminoácidos polares. La hidrofobicidad aumenta con la longitud de la cadena lateral alifática.
- 2- Los aminoácidos con cadenas polares sin carga (hidrófilos) tienen grupos funcionales neutros y polares que son capaces de formar enlaces de hidrógeno con algunas moléculas tales como el agua. La polaridad de la Serina (Ser), Treonina (Tre) y Tirosina (Tir) dependen del grupo hidroxilo (-OH), la polaridad de la Aspragina (Asp) y Glutamina (Glu) de su grupo amida (-CO-NH<sub>2</sub>) y la polaridad de la Cisteina (Cis) de su grupo tiol (-SH). También se incluye en este grupo la Glicina (Gly).
- 3- Los aminoácidos con cadena lateral cargada positivamente (a pH próximo a 7): Lisina (Lis), Arginina (Arg) e Histidina (His).
- 4- Los aminoácidos con cadena lateral cargada negativamente (a pH próximo a 7) son los ácidos Aspártico (Asp) y Glutamina (Glu).

Desde el punto de vista químico, la polimerización de los aminoácidos es una reacción de deshidratación, tal y como se muestra en la Figura 2.

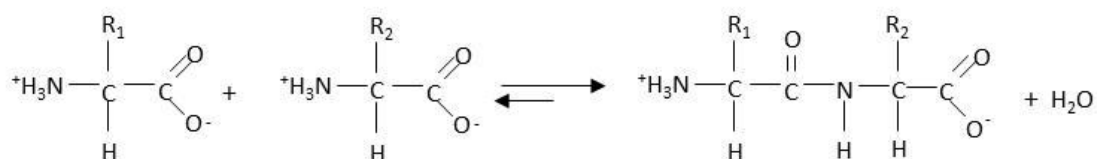


Figura 2. Fundamento químico de la formación de un enlace peptídico.

En esta figura se muestra como el grupo  $\alpha$ -carboxílico de un aminoácido con cadena lateral  $R_1$ , puede unirse covalentemente con el grupo  $\alpha$ - $\text{NH}_2$  de un aminoácido con cadena lateral  $R_2$ , eliminando una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  y formando un tipo de enlace amida conocido como enlace peptídico.

La secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas se conoce como estructura primaria de la proteína. Esta es la que confiere a la proteína sus propiedades físicas y hace que una secuencia polipeptídica se pliegue en una estructura única adquiriendo su función y papel característicos.

La estructura secundaria está relacionada con el ordenamiento espacial de los residuos de aminoácidos próximos entre sí, en la secuencia lineal. Algunas de estas relaciones estéricas son de naturaleza regular, originando unas estructuras periódicas llamadas hélice  $\alpha$  y lámina plegada  $\beta$  que son elementos de estructura secundaria. La hélice  $\alpha$  es una estructura semejante a un cilindro.

En la mayoría de las proteínas globulares de estructuras terciarias conocidas y solubles en agua, los aminoácidos hidrófobos tienden a colocarse hacia el interior de la molécula, mientras que los aminoácidos polares se reparten, especialmente en la

superficie, de una manera bastante uniforme (sirva como ejemplo la hemoglobina). En el caso de ciertas proteínas que son insolubles en agua, pero solubles en determinados disolventes, la disposición de aminoácidos es justamente a la inversa.

La estructura cuaternaria de las proteínas es el resultado de asociaciones no covalentes de subunidades proteicas. Las fuerzas o enlaces que estabilizan las estructuras cuaternarias son los mismos que los que estabilizan las estructuras terciarias con excepción de las uniones disulfuro entre cisteínas.

## **2.2 SANGRE: CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES.**

### **2.2.1 Composición.**

La sangre es un líquido viscoso, consistente en una suspensión de células (leucocitos, eritrocitos y plaquetas) en un medio coloidal, llamado plasma. La sangre es un tejido más del organismo, de origen mesenquimatoso y muy especializado<sup>109</sup>. La sangre es opaca, debido al gran número de células presentes, y de color rojo, a causa de la hemoglobina que portan los glóbulos rojos<sup>46</sup>. El conjunto de leucocitos, eritrocitos y plaquetas reciben el nombre de elementos formes y, gracias a que se hallan suspendidos en el plasma, confieren a la sangre su fluidez característica. La sangre es un tejido muy rico en proteínas, ya que hasta un 18% de su peso está formado por estas moléculas, de ahí que se plantee la necesidad de recuperar y analizar la aplicación de las mismas.

La cantidad de sangre en un animal vivo es variable según especie, sexo o edad. En todos los casos, durante el proceso de sangrado en el matadero, tan solo es aprovechable un determinado porcentaje respecto al peso vivo del animal. La eficacia de desangrado puede ser definida como el volumen de sangre residual o sangre retenida en los músculos después del sacrificio. Este parámetro tiene una importancia

considerable en la capacidad de conservación de las canales en el cuarto de refrigeración, y de cara a garantizar la perduración de la carne, exhibida al público. Hace años, la cantidad de sangre que podía quedar retenida en la canal era de alrededor del 50%<sup>5</sup>. Sin embargo, a día de hoy, los animales se sangran en condiciones tales que se puede recuperar el 60% de sangre, quedando un 20-25 % retenida en las vísceras y el 15-20% restante en la canal (músculo, grasa, huesos, etc). Cabe señalar que, en la carne, la sangre retenida está entre 2-9mL/kg de músculo.

### 2.2.2 Funciones.

Debido a su composición y estructura, la sangre tiene múltiples funciones en el organismo animal, tales como:

1. Respiratoria: transporta el oxígeno desde el pulmón a todas las estructuras del organismo.
2. Nutritiva: lleva las sustancias nutritivas absorbidas en el intestino o elaboradas por el propio organismo, para ser utilizadas por los diferentes tejidos.
3. De regulación térmica: por su elevado calor específico y su constante circulación, distribuye el calor y tiende a igualar las diferentes zonas del cuerpo, además de transportar calor a superficies donde se pierde por evaporación.
4. Excretora: arrastra los restos catabólicos para ser eliminados.
5. Inmunizante: transporta leucocitos, anticuerpos y sustancias protectoras.
6. Equilibrio acuoso del organismo: transporta e intercambia agua entre los diversos compartimentos líquidos.

7. Reguladora de la presión osmótica, del equilibrio ácido-base, del equilibrio iónico y de la presión arterial.

### **2.3 USOS DE LA SANGRE**

La sangre de los animales tiene muchas posibilidades de empleo en diferentes productos e industrias, donde la alimentaria y de fabricación de piensos para animales son las más destacadas. Sin embargo, la sangre también se emplea en laboratorios, para usos médicos, como producto industrial y como fertilizante. A continuación se describen en más detalle todas estas posibilidades de empleo.

#### **2.3.1 Industria alimentaria**

La sangre y sus fracciones se adicionan a una amplia gama de alimentos con fines diversos:

- Como estabilizante
- Como aditivo de color
- Como componente nutricional

La adición de la sangre en alimentos como embutidos, morcillas, sopas, pan, etc., aumenta su capacidad nutritiva y mejoran la textura y jugosidad del mismo. El problema que tiene la utilización directa de la sangre en alimentos, en cantidades superiores a un pequeño porcentaje (en torno al 1%), es que provoca que se oscurezcan, por efecto de la hemoglobina, con lo que su aspecto es poco apetecible. Por ello, el empleo principal de la sangre está ligado tradicionalmente a productos de color oscuro como las morcillas, embutidos de sangre, etc. Sin embargo, el consumo de estos productos es muy limitado.

Con la finalidad de ampliar el rango de aplicación de la sangre en productos alimentarios, se han propuesto diversas alternativas: como reducir el color oscuro con el uso de peróxido de hidrógeno<sup>87</sup>; o utilizar la fracción plasmática para evitar el efecto de coloración, que contiene todas las proteínas sanguíneas excepto la hemoglobina. Así, el plasma se emplea en la fabricación de embutidos, preparados cárnicos y otros alimentos.

Sin embargo, si sólo se utiliza el plasma, se desaprovechan una gran proporción de las proteínas cárnicas. Cuando el plasma sanguíneo se separa, una gran parte de las proteínas de la sangre (60%) queda en la fracción hemoglobina de los eritrocitos. La fracción decolorada se comporta como un ingrediente inerte cuando se añade a los embutidos, haciendo que los productos sean más blandos y modificando el color. En contraste con el plasma, la fracción globina no forma geles al calentarse, aunque se hincha y tiene una gran capacidad de retener agua<sup>119, 120</sup>. Así mismo, la fracción globina tiene una mayor capacidad de formar espuma<sup>33</sup>. La principal función de la globina cuando se añade a un producto cárnico es la de aumentar la capacidad de retener agua<sup>47</sup>.

### **2.3.2 Fabricación de piensos**

La sangre puede emplearse como ingrediente en la fabricación de piensos elaborados, jugando diversos papeles:

- Como suplemento de lisina: este aminoácido suele ser un factor limitante en el crecimiento de muchos seres vivos y su contenido en los cereales (que constituye el grueso de la alimentación del ganado) es bajo.
- Componente nutricional: para resaltar la importancia de la sangre como el alimento, se puede decir que se obtiene la misma cantidad de proteínas de un kilogramo de sangre

que de uno de carne. Entre los productos derivados de la sangre destinados a este fin, el más importante es la harina de sangre. La harina de sangre es un producto granular de color marrón oscuro y bajo contenido en humedad, obtenido por la desecación de la sangre entera o de sus componentes pesados, después de recoger el suero o plasma. El principio de la separación consiste en eliminar la mayor cantidad de agua, ya sea por medio de secado o de una mezcla de productos absorbentes. El rendimiento de harina de sangre a partir de la sangre entera es aproximadamente del 20%. Se emplea en piensos para animales, siendo menos digestible que la harina de carne. La baja digestibilidad de la harina de sangre hace que se aprecie más el empleo de plasma deshidratado como complemento a las proteínas de los cereales

Por otro lado, también se puede emplear la sangre entera directamente en alimentación animal, respetando la legalidad vigente, incluyendo el evitar el canibalismo<sup>95</sup>. La sangre se puede mantener líquida, sin necesidad de anticoagulantes, sometiéndola a agitación energética. A la sangre se le añade metabisulfito sódico al 1%, y se mezcla con una disolución de ácido clorhídrico al 20% para conseguir un pH de 3.2, que la estabiliza. La sangre conservada se puede mantener sin refrigeración y se emplea en piensos a razón de 0.3 kg/día. Si bien la aquí descrita es la más común, existen otras técnicas de conservación para su implantación en las dietas de animales terrestres o acuáticos.

### **2.3.3 Laboratorio y medicina**

Existen numerosas aplicaciones para los productos de la sangre en laboratorios clínicos, de investigación y de control de calidad. El uso más común es el empleo de la sangre como nutriente para medios de cultivo celular y como ingrediente requerido en

algunos tipos de agar para uso bacteriológico. Una de las fracciones de la sangre, el plasma estéril conservado en refrigeración, en congelación o liofilizado, se emplea en laboratorio como solución modelo para valorar la actividad de los enzimas proteolíticos, como medio para la propagación de virus, en la producción de venenos víricos, como medio bacteriológico y en la investigación del cáncer.

En el campo de la medicina la sangre entera no tiene aplicación directa. Son sus fracciones, y más concretamente determinadas proteínas plasmáticas las que sí tienen importancia en usos médicos.

### **2.3.4 Fertilizantes**

La sangre se emplea como fertilizante, en cuyo caso, además de aportar nitrógeno, contribuye a la formación de humus y mejora la estructura del suelo. La sangre también es útil en el revestimiento de semilla y regulación del pH del suelo. Sin embargo, el uso de la sangre como fertilizante no está muy extendido por presentar el inconveniente de que atrae a ratas y otros parásitos.

### **2.3.5 Otros usos industriales**

Existe una gran variedad de usos de la sangre como aditivo en diferentes industrias. Entre ellos, podemos incluir:

- Aditivo en la fabricación de diversos tipos de adhesivos, debido a su capacidad para formar películas en papeles, fibras, plásticos en la industria de las colas.
- Aditivo en la fabricación de insecticidas y fungicidas.



, Industria cerámica y en la fabricación de hormigón poroso.

-Aditivo de acabado en la la preparación de cueros

-Aditivo en la fabricación de espumas extintoras contra el fuego (espumas de sangre), que retardan la formación de vapores y limitan el aporte de oxígeno de a las llamas.

-En la fabricación de materiales absorbentes de gases, en forma de carbón de sangre (contiene 80% de carbón).

## **2.4 FRACCIONES SANGUÍNEAS: PLASMA/SUERO Y CÉLULAS.**

### **2.4.1 Plasma/suero**

El plasma sanguíneo es un líquido claro, de color amarillento o anaranjado, opalescente y ligeramente viscoso. Se debe hacer una distinción entre suero y plasma sanguíneo. El plasma se obtiene por adición temprana a la sangre recién obtenida de sustancias anticoagulantes, que impiden la formación de redes de fibrina, y posterior separación de las células, generalmente por un proceso de centrifugación. El suero sanguíneo, por el contrario, se obtiene desfibrinando la sangre, esto es, forzando la coagulación de la misma, formándose grandes mallas fibrinosas (coágulos) mediante agitación con paletas, que son retenidas posteriormente<sup>90</sup>. Tras ello, se somete a centrifugación y se separan así las células del suero sanguíneo. La única diferencia, en cuanto a composición se refiere, es la presencia de la proteína fibrinógeno en el plasma y su ausencia en el suero<sup>24</sup>.

En la Tabla 4 se muestra la composición porcentual del plasma íntegro y desecado. Dentro de la fracción sólida del plasma, la proteína es la que se encuentra en

mayor proporción, entre el 90 y el 95 %, lo cual equivale a un 6-8% en el plasma íntegro. Las proteínas plasmáticas se dividen principalmente en dos grandes fracciones que incluyen una gran cantidad de proteínas:

- Fracción de globulinas: es la fracción precipitada o salinizada por semisaturación con sulfato amónico.
- Fracción de albúminas: es la fracción precipitada por saturación completa con sulfato amónico.

Aparte de las mencionadas fracciones, existen otras fracciones minoritarias, como las lipoproteínas y las glucoproteínas. En la Tabla 5 se muestran los porcentajes de las diferentes proteínas plasmáticas en la sangre de bovino. Cabe señalar que la composición de las distintas especies proteicas integrantes varía según la especie animal.

*Tabla 4. Composición química del plasma bovino<sup>85</sup>.*

<b>Componente</b>	<b>Plasma sanguíneo</b>	<b>Plasma desecado</b>
Sólidos totales (%)	8-9	96-97,5
Proteína (%)	6-8	70-96
Grasa (%)	0,1-1	0-1,5
Carbohidratos (%)	<1	-
Sales (%)	1,5	<2
Agua (%)	90-91	2,5-7,0

Tabla 5. Porcentaje de las distintas fracciones proteicas del plasma bovino<sup>67</sup>.

<b>PROTEÍNA</b>	<b>% EN PLASMA BOVINO</b>
<b>Fracción albúmina</b>	<b>42</b>
Proalbúmina	0.3
Albúmina	41
<b>Fracción globulina</b>	<b>56</b>
$\alpha$ -Globulina	14
$\beta$ -Globulina	11
$\gamma$ -Globulina	31
<b>Fibrinógeno</b>	<b>2</b>

#### 2.4.2 Fracción celular

Los sólidos representan prácticamente en torno a un tercio del total de la sangre. Se engloban en este grupo los hematíes, las plaquetas y los leucocitos. Los valores normales en sangre son de  $4.5 \cdot 10^6$  -  $5 \cdot 10^6$  hematíes /mL,  $15 \cdot 10^4$  -  $3 \cdot 10^5$  plaquetas/mL y  $6 \cdot 10^3$  -  $9 \cdot 10^6$  leucocitos/mL. Así pues, la mayor parte de estos elementos formes son hematíes que contienen en su interior la hemoglobina (proteína que representa alrededor de dos tercios de la masa de las proteínas de la sangre, constituyendo el otro tercio el resto de proteínas plasmáticas). Las proteínas de los leucocitos y plaquetas representan cantidades insignificantes del total de proteínas de la sangre<sup>109</sup>. En la Tabla 6 se reflejan los valores medios de los componentes principales de los hematíes.

*Tabla 6. Composición de las células rojas<sup>85</sup>.*

<b>Componente</b>	<b>Concentrado de células rojas</b>	<b>Globina desecada</b>
Sólidos totales (%)	28-37	96,5
Proteína (%)	28-38	91-95,4
Grasa (%)	1	0
Carbohidratos (%)	<1	-
Sales (%)	1-3	1-6
Agua (%)	61-63	3,5

## **2.5 PROTEÍNAS SANGUÍNEAS**

### **2.5.1 Proteínas plasmáticas**

En la composición química del plasma las proteínas representan entre el 91 y el 95% del total, lo que significa que el plasma está formado prácticamente por agua y proteínas. Los principales parámetros de las fracciones plasmáticas obtenidas (fracción albúmina, fracción globulina y fracción fibrinógeno), se resumen en la Tabla 7.

*Tabla 7. Principales parámetros físicos de las proteínas plasmáticas.*

	<b>Albúmina</b>	<b>Globulinas</b>	<b>Fibrinógeno</b>
Peso molecular (kDa)	67	4-1000	341
Longitud (Å)	150	185-300	700
Diámetro (Å)	38	37-185	38
Punto isoeléctrico	4,7	4,9-7,3	5,3
Carga neta (pH=7,4)	18	-	-
Cte. Sedimentación (s)	4,6	5-7,2	9
Movilidad electroforética	6	0,8-5,1	1,9

### 2.5.2 Proteínas celulares: hemoglobina

La proteína mayoritariamente presente en la fracción celular es la hemoglobina, que se encuentra en el interior de los hematíes. Los hematíes son células sin núcleo, ya que lo pierden junto con el resto de orgánulos citoplasmáticos en el proceso de la hematopoyesis (formación y maduración de elementos formes de la sangre). Al vaciar estas células por shock osmótico se obtienen fácilmente precipitados de glóbulos rojos que no poseen más que su membrana plasmática, y un sobrenadante rico en hemoglobina.

La hemoglobina tiene un peso molecular de 64 kDa y su punto isoeléctrico de 6.8. Está constituida por dos cadenas alfa (141 restos aminoacídicos) y dos cadenas beta

(146 restos aminoacídicos), a cada una de las cuales se halla unido un resto hemo mediante enlaces no covalentes. Las características conformacionales de la estructura de la hemoglobina le confieren una serie de propiedades, de las que la más destacable es su elevada afinidad por el oxígeno, lo que hace que sirva de transportador de esa molécula en el interior de los seres vivos. En la hemoglobina hay muy poco contacto entre las dos cadenas alfa y beta, pero son numerosos los contactos de grupos R entre los pares pertenecientes a diferentes cadenas. Los grupos hemo se localizan uno en cada subunidad y se unen a cuatro moléculas de oxígeno. Son moléculas planas en las cuales los átomos de hierro forman complejos de coordinación planares cuadrados, que se hallan muy separados unos de otros y situados a diferentes ángulos relativos. Cada uno de ellos se encuentran parcialmente envuelto en una bolsa forrada por grupos R no polares. El quinto enlace coordinado de cada átomo de hierro se establece con un nitrógeno imidazólico de un resto de histidina, quedando la sexta posición disponible para su coordinación con una molécula de oxígeno. Existe una cavidad central dentro de la molécula de hemoglobina, forrada con grupos R polares<sup>13</sup>. La estructura tridimensional de la hemoglobina se muestra en la Figura 3.

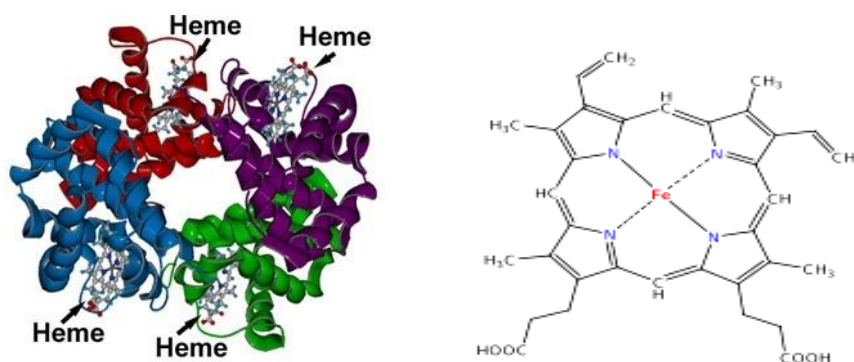


Figura 3. Estructura tridimensional de la hemoglobina, con los grupos hemo señalados mediante flechas (izquierda). Estructura química de cada uno de los grupos hemo que constituyen la hemoglobina (derecha).

### 2.5.3 Usos de la hemoglobina

La hemoglobina obtenida de la sangre de animales tiene múltiples aplicaciones, entre las que cabe destacar:

- Aplicaciones como aditivo alimentario: como suplemento proteico para incrementar su cantidad de proteína.
- Aplicación como foto-sintetizadores<sup>18, 19</sup>. Se han realizado trabajos consistentes en preparar hidrolizados peptídicos conteniendo porfirinas hidrofóbicas a partir de hemoglobina bovina y se han comprobado sus propiedades fotosintetizadoras.
- Regulación de la presión sanguínea<sup>137</sup>. Se han realizado estudios consistentes en hidrolizar la hemoglobina bovina para obtener hemorfinas utilizadas en la inhibición de la actividad enzimática ACE (Angiotensina Convering Enzyme). ACE tiene una importante función fisiológica en la regulación de la presión sanguínea ya que convierte un decapeptido inactivo (Angiotensina I) en un potente vasopresor (Angiotensina II).
- Aplicaciones como transportador de oxígeno<sup>58</sup>. Estas aplicaciones están basadas principalmente en la excepcional capacidad de fijación del oxígeno que posee la hemoglobina en su disponibilidad.
- Aplicación en cultivos celulares<sup>40</sup>. El uso de estos hidrolizados de hemoglobina en medios de cultivo es recomendable, dada la serie de ventajas que presenta: (i) la preparación de un medio de cultivo, (ii) el coste, en algunos casos, es mucho menor y (iii) presenta una fuente de aminoácidos más constante y definida que las peptonas comunes, ya que la composición de la hemoglobina está determinada genéticamente.

## **2.6 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS Y SU APLICACIÓN TECNOLÓGICA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

Las propiedades funcionales de las proteínas, son propiedades físico-químicas que les permiten contribuir a las características organolépticas deseadas de un alimento. Se ha comprobado como las proteínas sanguíneas poseen tan buenas propiedades como otras proteínas actualmente comercializadas, entre ellas, las procedentes del huevo y del suero de la leche<sup>25, 73</sup>.

Estas propiedades se pueden clasificar en tres grupos principales:

- Propiedades de hidratación, dependientes de interacciones proteína-agua. En este grupo se incluyen propiedades tales como la absorción y retención de agua, succulencia, hinchado, adhesión, dispersabilidad, solubilidad y viscosidad.
- Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína. Este grupo de propiedades interviene en fenómenos tales como la precipitación, gelificación y formación de estructuras diferentes (fibras y pastas proteicas, por ejemplo).
- Propiedades superficiales, referidas a la tensión superficial de emulsificación y características espumantes de las proteínas.

Estos grupos no son totalmente independientes; por ejemplo, la gelificación no sólo implica interacciones proteína-proteína, sino también las interacciones proteína-agua y la viscosidad y la solubilidad dependen ambas tanto de las interacciones proteína-agua como de las interacciones proteína-proteína.

Sin embargo, la mayor parte de los ingredientes proteicos disponibles para uso industrial son mezclas de proteínas que contienen cantidades apreciables de glúcidos, lípidos, sales minerales, polifenoles, etc. lo que dificulta su estudio y determinación..



### 2.6.1 Solubilidad

La solubilidad de las proteínas en agua depende de numerosos parámetros. Desde el punto de vista termodinámico, la solubilización corresponde a una disociación simultánea de las moléculas del disolvente y de las moléculas de proteínas, seguida de una dispersión de estas últimas en el disolvente, de modo que se produce una superficie interfacial de máximo contacto entre la proteína y el disolvente. Por tanto, para que una proteína pueda solubilizarse será necesario que reaccione, en todo lo posible, con el disolvente (mediante enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e iónicas).

#### Influencia del pH

Para entender la influencia del pH en la solubilidad de una proteína debemos definir que es el punto isoeléctrico (pI): *es el pH al que una sustancia anfótera tiene carga neta cero*. A este valor de pH la solubilidad de la sustancia es casi nula. Sin embargo, si una proteína se encuentra en disolución a un pH superior o inferior a su punto isoeléctrico, estará cargada positiva o negativamente lo que influye de forma favorable en su solubilidad por dos motivos: por un lado, las moléculas de agua reaccionan con estas cargas contribuyendo así a su solubilización. Por otro lado, las cadenas proteicas que llevan cargas eléctricas del mismo signo tienen tendencia a repelerse y por tanto a disociarse y desdoblarse, lo que facilita su solubilidad en el disolvente. Si se representa las variaciones de la solubilidad de una proteína en función del pH, se obtiene una curva en forma de V o U, en la que el mínimo representa el punto isoeléctrico. Disoluciones con un pH cercano al pI, provocan que las cadenas polipeptídicas interactúen entre sí y formen agregados que conduzcan a la precipitación. La cantidad de precipitado aumenta cuando la densidad de los agregados

difiere mucho de la del disolvente y cuanto mayor es el diámetro de los nuevos agregados.

### Influencia de la fuerza iónica, $\mu$

La solubilidad de una proteína es sensible a la concentración de sal en el medio, expresada en términos de fuerza iónica. Así, los iones de las sales neutras, con molaridades comprendidas entre 0.5 y 1 M, pueden aumentar la solubilidad de las proteínas, lo que se conoce como efecto *salting-in*. Los iones reaccionan con las cargas de las proteínas y rebajan la atracción electrostática entre las cargas opuestas de grupos próximos, lo que aumenta la solvatación de las proteínas y por tanto su solubilidad. Sin embargo, si la concentración de las sales neutras es superior a 1M, se produce el efecto contrario y la solubilidad de las proteínas decrece, pudiendo conducir a una precipitación. Este efecto de hinchazón (*salting-out*) resulta de la competencia entre proteína e iones salinos por las moléculas de agua necesarias para su solvatación respectiva.

### Influencia de los disolventes

La adición de algunos disolventes, tales como el etanol o la acetona, a una solución acuosa de proteínas rebaja la constante dieléctrica del medio. Estos disolventes entran así en competencia con las moléculas del agua y por tanto reduce la solubilidad de las proteínas. De esta forma disminuyen las fuerzas electrostáticas de repulsión existentes entre las moléculas proteicas, lo que contribuye a su agregación y precipitación.

### 2.6.2 Propiedades emulsificantes.

Las emulsiones son dispersiones de dos líquidos no miscibles o parcialmente miscibles, de los cuales uno se encuentra bajo la forma de una fase continua dispersante y el otro se encuentra disperso, formando glóbulos como se muestran en la Figura 4. La mayor parte de las emulsiones alimenticias son del tipo aceite en agua (O/W) o bien agua en aceite (W/O). El término agua designa un líquido polar hidrófobo que generalmente es una solución acuosa, mientras que el término aceite indica un líquido hidrófobo (grasa fundida, aceite vegetal o animal, aceites esenciales, etc.).

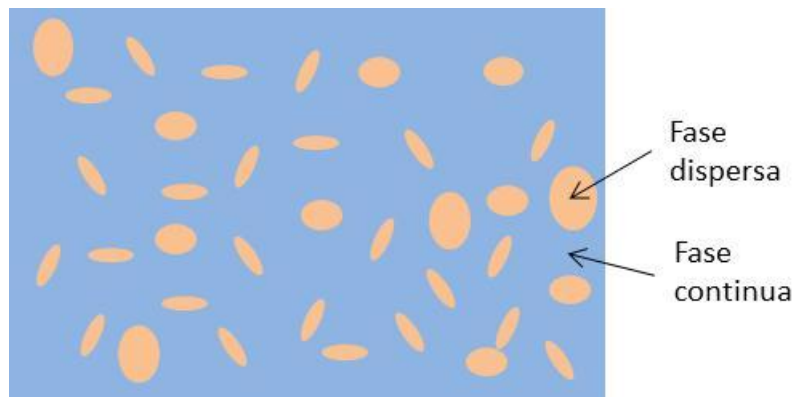


Figura 4. Esquema de las dos fases de una emulsión.

La mayoría de emulsiones no son estables por sí mismas, sino que los glóbulos de la fase dispersa tienden a coalescer, uniéndose para formar gotas más grandes, lo que finalmente conduce a una separación de las dos fases. Por ello, en la mayoría de emulsiones hay presente un agente emulsionante, responsable de estabilizar la emulsión a través de varios mecanismos. Ejemplos de agentes emulsionantes son:

- Electrolitos minerales, que aportan cargas electrostáticas a las gotas dispersas.

- Las moléculas tensioactivas (surfactantes), de estructura anfipolar, que se orientan de tal forma que colocan sus extremidades hidrófobas e hidrofílicas a los dos lados de la interfase aceite-agua respectivamente. La acumulación de estas moléculas en la interfase disminuye considerablemente la tensión interfacial.
- Las materias insolubles finamente divididas, mojadas por las dos fases y absorbidas en la interfase, que forman barrera contra la coalescencia.
- Las macromoléculas disueltas en la fase continua, que tienen un papel estabilizante, ya sea porque aumentan la viscosidad de esta fase (como ocurre con los polisacáridos espesantes llamados emulsionantes secundarios) o porque se adsorben en la interfase<sup>36</sup>.

Los factores que influyen en las propiedades de las emulsiones y los resultados de los ensayos de emulsión se pueden agrupar en cinco tipos:

1. Temperatura, pH y fuerza iónica.
2. Concentración de proteína soluble y naturaleza de la misma.
3. Característica del aceite (punto de fusión, velocidad de adición del aceite, volumen de la fase lipídica).
4. Presencia de azúcares, de surfactantes de bajo peso molecular y exposición al oxígeno.
5. Tipo y diseño del equipo y su intensidad de agitación.

Proteínas situadas cerca de su pI no pueden contribuir a la carga superficial de las gotitas de aceite, causa de la estabilización de la emulsión por sus repulsiones

electrostáticas<sup>26</sup>, por lo que su capacidad emulsionante se disminuye. Además, las proteínas no solubles contribuyen muy poco a estabilizar las emulsiones, ya que no pueden interaccionar con la interfase formada.

Por otro lado, Dill<sup>36</sup> demostró que la adición de surfactantes de bajo peso molecular no favorece la estabilidad de emulsiones estabilizadas por las proteínas, porque esos surfactante rebajan la firmeza de las películas proteicas y disminuyen las fuerzas que mantienen las proteínas en la interfase.

Las proteínas, como ya se ha mencionado, son buenos agentes estabilizadores de emulsiones. Por tanto, analizar la capacidad emulsionante de las proteínas nativas y la influencia que puede tener la conjugación en este parámetro, se estableció como uno de los objetivos de este trabajo.

### **2.6.3 Propiedades espumantes**

Las espumas son dispersiones de gotas de gas en una fase continua líquida o semisólida que contienen una sustancia soluble con propiedades surfactantes. Existe una gran variedad de espumas o batidos alimenticios, de consistencia muy diversa, tales como el merengue, bizcochos y algunos productos de pastelería y confitería. El gas es el aire (eventualmente carbónico) y la fase continúa una solución o suspensión acuosa que contiene las proteínas. En las espumas hay una fase continua de capas líquidas delgadas, llamadas laminillas, que separan las burbujas de gas.

Al igual que ocurre con las emulsiones, para mantener la interfase en las espumas, y evitar la coalescencia de las burbujas de gas, se necesita la presencia de agentes de superficie que rebajen la tensión de la interfase y formen una barrera

protectora elástica entre las burbujas de gas atrapadas. Algunas proteínas tienen la capacidad de formar dicha película protectora, que se adsorbe en la interfase gas/líquido. Las burbujas del gas de las espumas pueden variar mucho de tamaño, oscilando de una micra a varios centímetros de diámetro, a causa de numerosos factores tales como la tensión superficial y viscosidad de la fase líquida, el aporte de energía, etc. Normalmente, una distribución uniforme de burbujas pequeñas da al alimento suavidad y ligereza, así como un aumento de la dispersión y perceptibilidad de aromas.

Las emulsiones y las espumas difieren significativamente en el hecho de que, en las segundas, la fracción de volumen ocupada por la fase dispersa (gas) varía en una escala mucho mayor que en las emulsiones. Frecuentemente las espumas son inestables, porque tienen una mayor superficie de interfase.

Las proteínas obtenidas a partir de la sangre de cerdo, son buenas candidatas para estudiar sus propiedades espumantes, con vistas a su posterior aplicación en los alimentos donde esta propiedad sea deseable.

### **2.6.4 Propiedades gelificantes**

Un gel es un sistema coloidal donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida. Cuando las proteínas se someten a un tratamiento térmico se origina un gel, la gelificación de proteínas inducida por el calor es una de las propiedades funcionales más importantes en el plasma de sangre de cerdo<sup>57</sup>. La información de esta propiedad es importante para un control de la textura y de la palatabilidad de los productos<sup>71</sup>. Los factores que más afectan a las propiedades de los geles obtenidos son el pH, la

concentración de proteína empleada para formarlos, el tipo de proteína usada y la fuerza iónica del medio.

La formación del gel siempre va precedida por una desnaturalización y posterior agregación y precipitación de las proteínas. Este fenómeno se produce siempre por encima de una temperatura umbral denominada  $T_{gel}$ , por debajo de la cual el proceso es reversible y la formación del gel no tiene lugar. Si la temperatura se eleva por encima de este umbral las proteínas forman una red tridimensional. Ésta se estabiliza, posiblemente, por la condensación de los aminoácidos carboxílicos y péptidos desplegados durante la etapa de enfriamiento, dando lugar a la formación del gel.

La formación de la red proteica se considera como resultado de un equilibrio entre las interacciones proteína-proteína, las interacciones proteína-disolvente (agua) y fuerzas atractivas y repulsivas entre cadenas polipeptídicas próximas. Las repulsiones electrostáticas (sobre todo a pH alejados del punto isoeléctrico) y las interacciones proteína-agua tienden a mantener separadas las cadenas polipeptídicas. Las atracciones proteicas intermoleculares (y la gelificación) se producen más rápidamente con concentraciones proteicas elevadas dada su mayor probabilidad de contactos intermoleculares.

A medida que la etapa de agregación sea más lenta con relación a la desnaturalización, más fácilmente podrán orientarse los polipéptidos, parcialmente desdoblados, antes de la agregación. Esto favorecerá la formación de un gel ordenado homogéneo, de consistencia lisa, fuertemente expandido, muy elástico, transparente y estable frente a la sinéresis y exudación. Por el contrario, los geles formados por partículas proteicas, groseramente agregados, son opacos, poco elásticos y claramente inestables (sinéresis y exudación).

Generalmente, el desdoblamiento de las moléculas proteicas aumenta la exposición de los grupos reactivos, en especial de los grupos hidrófobos de las proteínas globulares. Las interacciones hidrófobas proteína-proteína, también resultan favorecidas y representan la causa principal de la posterior agregación. Al tener las proteínas una masa molecular elevada y un fuerte porcentaje de aminoácidos hidrófobos, tendrán tendencias a formar redes más compactas. Las interacciones hidrófobas resultan favorecidas a temperaturas elevadas, mientras que la formación de enlaces hidrófobos se favorece durante el enfriamiento. En adición, el calentamiento puede liberar los grupos -SH internos y promover la formación o el cambio de uniones disulfuro. La presencia de un gran número de grupos -SH y -S-S reforzará la red intermolecular y tendrá tendencia a hacer el gel térmicamente irreversible. Del mismo modo, las uniones calcio mejoran la firmeza y estabilidad de numerosos geles.

Las proteínas que poseen altos porcentajes de aminoácidos hidrófobos (más del 31.5% sobre una base molar) tales como la hemoglobina, catalasa, ovoalbúmina y ureasa, tendrán, en general, zonas de pH de gelificación dependiente de la concentración proteica. En contraposición, las proteínas que tengan un débil porcentaje de aminoácidos hidrófobos (22-31.5%), tales como las  $\gamma$ -globulinas, alfa-quimotripsina, protrombina, seroalbúmina, conalbúmina, ovomucoide, gelatina y las proteínas de soja, no presentarán modificaciones de la zona de pH de gelificación ante variaciones de la concentración proteica. Esta diferencia de comportamiento puede servir de base para clasificar los geles obtenidos mediante calentamiento en dos categorías:

- 1) Las proteínas que a baja concentración proteica precipitan por el calor y, a alta concentración proteica generan un gel opaco. Ejemplo de este tipo de proteínas es la hemoglobina.



2) Las proteínas que a baja concentración proteica permanecen solubles durante el calentamiento y, a alta concentración proteica, dan un gel claro y termorreversible. Un ejemplo de este tipo de proteínas es la gelatina y el plasma sanguíneo.

En este trabajo se evaluó a que concentración las proteínas de la sangre y sus derivados, conseguidos por conjugación con dextrano de 10 kDa, eran capaces de formar geles; a que temperatura estos geles se formaban y la dureza de los mismos.

### **2.6.5 Aplicación tecnológica de las propiedades funcionales de las proteínas**

En un mismo alimento intervienen habitualmente varias propiedades al mismo tiempo, como se muestra en la Tabla 8. Los aislados de proteínas sanguíneas son una fuente muy importante de nutrientes para la alimentación humana, por lo que el conocimiento de su funcionalidad puede ser muy útil de cara a su posible adición como ingrediente proteico en distintas formulaciones alimentarias y de nuevos productos.

A la vista de la Tabla 8 es fácil adivinar el importante papel que juegan las proteínas a la hora de conseguir las propiedades funcionales deseadas en un alimento. Algunas de estas propiedades afectan a características sensoriales, pero también pueden influir sobre el comportamiento físico del alimento o sus ingredientes durante la preparación, transformación o almacenamiento.

El estudio de estas propiedades funcionales, para la aplicación de las proteínas recuperadas de la sangre, ofrece un beneficio doble: por un lado reducir la cantidad de residuos que la industria cárnica produce y por otro, la revalorización el hecho de darle un valor añadido a un producto que habitualmente es simplemente secado o incinerado.

*Tabla 8. Propiedades funcionales que intervienen en diversos alimentos.*

<b>Alimento</b>	<b>Propiedades</b>
Bebidas	Solubilidad a pH diferentes, estabilidad al calor, viscosidad
Potajes, salsas	Viscosidad, emulsificación, retención de agua
Masa de panadería	Propiedades viscoelásticas, cohesión, desnaturalización por el calor, gelificación
Productos de panadería y de pastelería	Absorción de agua, emulsificación, espumado, pardeamiento
Productos lácteos	Emulsificación, retención de materia grasa, viscosidad, espumados, gelificación, coagulación
Reemplazantes de huevo	Espumado, gelificación
Productos cárnicos	Emulsificación, gelificación, Cohesión, absorción, retención de agua y de materia grasa
Productos similares a la carne	Retención de agua y de materia grasa, Insolubilidad, firmeza, masticabilidad, cohesión, desnaturalización por el calor.
Recubrimientos alimenticios	Cohesión, adhesión
Productos de confitería y chocolatería	Dispersabilidad, emulsificación

## 2.7 CONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS CON HIDRATOS DE CARBONO

A lo largo de este capítulo se ha indicado en varias ocasiones la importancia de las proteínas dentro de la industria alimentaria, debido a su capacidad de aportar propiedades únicas como la emulsificación, espumación, gelificación o solubilidad. Estas propiedades dependen tanto de factores intrínsecos como extrínsecos. En los últimos años ha surgido un gran interés en la búsqueda de nuevas técnicas y herramientas para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas modificando su estructura química. Esta búsqueda ha dado como resultado nuevos métodos como la acetilación, la desamidación y la succinilación. Del mismo modo las propiedades funcionales pueden ser modificadas por la unión covalente de las mismas con polisacáridos o pequeños azúcares<sup>1, 6, 17, 113</sup>.

Para propósitos alimentarios, la reacción de Maillard es una de las más prometedoras técnicas, puesto que el método no precisa de la adición de productos químicos incompatibles con los requerimientos de la industria alimentaria. Se ha documentado la conjugación de proteínas procedentes de huevo, de la soja o de BSA para incrementar y modificar sus propiedades funcionales<sup>62, 63, 64, 65, 101</sup>. Sin embargo, en la medida de nuestro conocimiento, hasta ahora no han sido modificadas mediante la reacción de Maillard fracciones proteicas procedentes de la sangre de cerdo; aunque si el plasma completo dializado<sup>12</sup>.

Una vez que las propiedades funcionales de las proteínas nativas fueron estudiadas, se planteó la opción de ampliar su rango de aplicación mediante su modificación. A través de la unión de las fracciones plasmáticas y celulares a un hidrato de carbono (en este caso dextrano de 10 kDa) se pretendía modificar sus propiedades

físico-químicas y por consiguiente modificar sus propiedades funcionales. A priori, este cambio aumentaría el rango de aplicación de las proteínas sanguíneas.

### 2.7.1 La reacción de Maillard

La reacción de Maillard, denominada técnicamente glicosilación no enzimática de proteínas, se trata de un conjunto complejo de reacciones químicas que se producen entre las proteínas y los azúcares reductores al calentar (no es necesario que sea a temperaturas muy altas, ya que incluso a temperaturas fisiológicas puede tener lugar<sup>80</sup>) los alimentos o mezclas similares.

La velocidad de la reacción de Maillard se incrementa con un aumento de la actividad del agua ( $a_w$ ), alcanzando su máximo a un rango de 0.6 ó 0.7, valores que se consiguen precisamente tras el proceso de liofilización. Sin embargo, la presencia de un exceso de agua puede inhibir dicho proceso. Por ello, es muy importante tener en cuenta que la reacción de Maillard se da solo en una atmósfera seca. Se diferencian tres fases sucesivas, reflejadas en la Figura 5, que se enumeran a continuación:

1. Las etapas tempranas de la reacción de Maillard conllevan una condensación entre el grupo carbonilo de un carbohidrato reductor con un grupo amino, principalmente el grupo  $\epsilon$  de los residuos lisina y de manera secundaria con histidina, triptófano y arginina<sup>6</sup>. Con aldosas esto conduce a la formación de una base de Schiff y la liberación de una molécula de agua.
2. En la segunda etapa, la base de Schiff se cicla al correspondiente N-glicosamino.
3. En la tercera etapa, el N-glicosamino se transforma de forma irreversible, mediante la reordenación de Amadori, en unos nuevos compuestos llamados quetosaminas.

Durante esta fase aparecen compuestos de colores amarillos muy ligeros y olores desagradables. En esta fase se produce la deshidratación de azúcares formándose las reductonas o dehidrorreductonas.

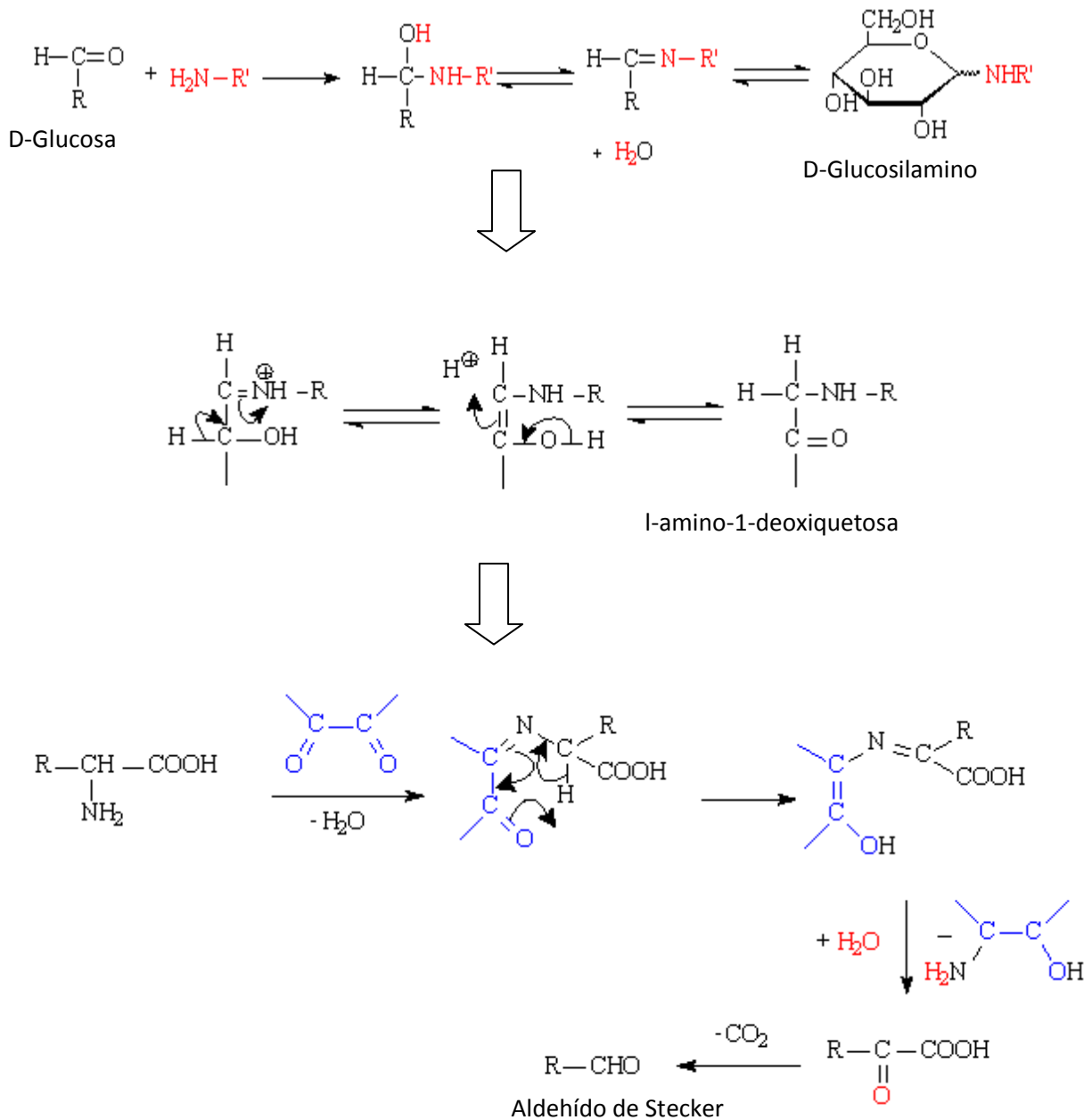


Figura 5. Cadena de reacciones que tienen lugar durante la reacción de Maillard y posterior reordenamiento de Amadori. Finalmente se forma el aldehído de Strecker.

4. En el paso posterior, conocido como degradación de Strecker, se generan compuestos reductores que facilitan la formación de los pigmentos, dando a lugar a un compuesto coloreado, insoluble y con contenido en nitrógeno polimérico. Los compuestos generados, denominados aldehídos de Strecker, son moléculas con bajo peso molecular que se detectan fácilmente por el olfato.

La última fase del proceso debe ser evitada por varias razones: los compuestos que se forman en la última fase del proceso pueden ser nocivos para la salud, pueden colorear el producto de una manera indeseada y aportan malos olores.

Dependiendo del lugar de unión de los carbohidratos durante la primera etapa de la reacción de Maillard, se producen dos tipos de compuestos, *N-Glicoproteínas* y *O-Glicoproteínas*.

- N-glicoproteína: todos los carbohidratos se unen al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido.
- O-Glicoproteína: en este caso, el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos es el lugar de unión.

### 2.7.2 Condiciones de la reacción.

La reacción de Maillard puede ser llevada a cabo de dos maneras: en condiciones húmedas o secas. De todos modos, como ya se dijo anteriormente, la actividad de agua ( $a_w$ ) óptima para este proceso se sitúa en valores comprendidos entre 0.5-0.8. En el rango más bajo de este margen de operación, la proteína aparece

finamente dividida en forma de polvo, formando aglomerados y sin agua libre entre las partículas.

Las reacciones en seco pueden ser llevadas a cabo después de liofilizar una disolución de la proteína con el azúcar reductor, seguido por un calentamiento a temperatura y humedad relativa controlada durante un tiempo determinado. Este tipo de reacciones son más deseables desde un punto de vista industrial, basado en la premisa de que requieren menos espacio y menos tiempo para conseguir el objetivo final que las reacciones en húmedo. Más aun, estas reacciones en seco producen una estabilidad térmica más duradera y un producto mucho más manejable y más fácil de almacenar que una disolución líquida. Algunas reacciones llevadas en seco, concretamente aquellas que conllevan la reacción de proteínas globulares, requieren de altos tiempos de reacción, cerca de 2 o 3 semanas. Estos elevados tiempos de reacción no son viables en la industria. Además, a escala de laboratorio, se utiliza la liofilización, lo cual puede no ser práctico desde un punto de vista industrial y por tanto requiere una mejora de las tecnologías actuales. Esto incluye una mejora de las condiciones de la reacción y la posible sustitución de la liofilización por el secado por espray.

### **2.7.3 Cambios en las propiedades funcionales de las proteínas conjugadas.**

La modificación química de las proteínas a través de su conjugación con hidratos de carbono conlleva modificaciones en sus propiedades funcionales<sup>86</sup>. Los cambios observados dependen tanto del tipo de hidrato de carbono empleado como del grado de conjugación conseguido.

### 2.7.3.1 Modificación de las propiedades gelificantes.

Se ha visto como soluciones de proteínas globulares calentadas en presencia de azúcares reductores (lactosa, ribosa o xilosa) originan geles que muestran un esfuerzo al estrés mucho mayor que cuando se hace en su ausencia, aunque por el contrario el color obtenido es mucho más oscuro. Estos cambios pueden ser atribuidos a que el azúcar induce una formación de uniones covalentes entre las proteínas. Incluso se ha comprobado como la cantidad de proteína necesaria para producir un gel disminuye considerablemente cuando se realiza en presencia de hidratos. Del mismo modo, al aumentar la cantidad de azúcar presente se puede reducir el tiempo necesario para la formación de geles.

Cuando se emplean hidratos de carbono de alto peso molecular, como el dextrano, el efecto conseguido es contrario al obtenido con los de bajo peso molecular<sup>130</sup>. En este caso, el hidrato tiene un efecto estérico muy importante y evita las interacciones proteína-proteína y que se formen enlaces hidrofóbicos y redes tridimensionales. Como resultado los geles obtenidos presentan menor resistencia al esfuerzo.

### 2.7.3.2 Modificación de las propiedades emulsionantes

Las glicoproteínas conseguidas a través de la reacción de Maillard presentan un gran incremento de su capacidad emulsionante, directamente relacionado con la longitud de la cadena del carbohidrato unido.

El carácter anfipático de las proteínas nativas se incrementa una vez ha sido unida a un azúcar ya que se agregan grupos hidrofílicos. Durante la emulsificación los



residuos hidrofóbicos de la proteína interactúan con las gotas del aceite, mientras que los hidratos atraen moléculas de agua alrededor de las gotas de aceite.

A medida que un mayor grado de conjugación se alcanza, se obtienen mejores propiedades emulsionantes. A partir de un cierto nivel, un efecto contrario se produce y la capacidad emulsionante desciende, ya que la proteína sufre impedimentos estéricos que no le permiten interactuar con la interfase agua/aceite durante la emulsificación.

### 2.7.3.3 Modificación de la solubilidad

Se ha comprobado que la glicosilación produce un marcado descenso o incremento de la solubilidad de las proteínas dependiendo del grado de conjugación obtenido<sup>64, 101</sup>. Esta propiedad se mejora hasta cierto grado de conjugación, a partir del cual disminuye hasta valores incluso menores que los iniciales. Además, las proteínas modificadas presentan diferente comportamiento de su solubilidad frente al pH, esto es debido a que el pI de la proteína se ve modificado

Se debe considerar que la conjugación produce una restricción en las interacciones proteína-proteína y proteína-solvente. En el primer caso ejerce un papel positivo, ya que impide la agregación y precipitación; y en el segundo caso el efecto es negativo ya que no permite las interacciones necesarias para solubilizar la proteína, esto ocurre a elevados grados de glicosilación.

### 2.7.3.4 Estabilidad térmica

En la industria alimentaria son frecuentes los tratamientos térmicos, los cuales pueden alterar las propiedades de las proteínas produciendo precipitaciones, desnaturalizaciones y ruptura de enlaces, lo que origina un descenso en su valor nutritivo. Por tanto, si se pudieran aplicar tratamientos térmicos de altas temperaturas a

proteínas modificadas sin temor a que sean degradadas o modificadas, sería un adelanto para su uso como ingrediente alimentario.

A medida que el azúcar unido a la proteína presenta un mayor peso molecular mejor resistencia térmica presenta el conjugado. Estudios realizados con dextrano de entre 10 y 20 kDa<sup>63</sup> dieron como resultado que no había diferencias significativas en la estabilidad térmica de los conjugados; sin embargo, sí que se apreciaban cuando se empleaban azúcares de entre 3,5 y 24 kDa<sup>64, 101</sup>.

El azúcar tiene en este caso un doble papel, por un lado protege a la proteína de la desnaturalización lo que impide su precipitación, y por otro lado evita las interacciones proteína-proteína que puede dar lugar a la formación de agregados que conllevan una pérdida de solubilidad durante el proceso de calentado.

### **2.8 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.**

En este apartado se expondrá la gran aplicación de las sustancias que tienen un efecto antioxidante y de sus beneficios como aditivo alimentario. Los hidrolizados de proteínas son algunos de los compuestos que más interés despiertan por tener muy buenas propiedades antioxidantes. Por tanto, la producción de péptidos a partir de la hemoglobina porcina (proteína mayoritaria de la sangre) y su evaluación como agente antioxidante fue uno de los objetivos planteados en este trabajo, para incrementar el rango de aplicación de la sangre procedente de mataderos.

Los antioxidantes son sustancias que protegen al organismo frente a los radicales libres (ya que se oxidan al interactuar con ellos, impidiendo que cualquier otra molécula o haga) que se forman durante los procesos de oxidación y que originan el denominado estrés oxidativo. Se han publicado evidencias de patologías en cuya

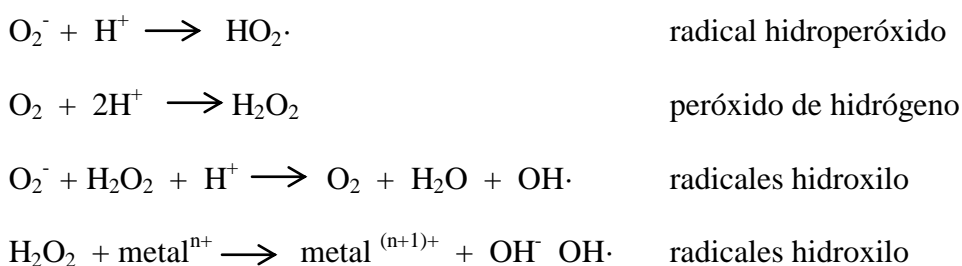
generación podrían participar los radicales libres, bien teniendo un efecto directo como en las enfermedades degenerativas del sistema nervioso (enfermedades de Alzheimer, de Parkinson y de Hodgkin<sup>106</sup>), o las cataratas<sup>108</sup>. O bien porque los mecanismos naturales de defensa contra el estrés oxidativo son neutralizados, como con el tabaquismo<sup>140</sup> o el alcoholismo<sup>3</sup>. Desde un punto de vista tecnológico los antioxidantes se pueden aplicar para conservar alimentos, impidiendo el enranciamiento de las grasas<sup>66</sup>.

### 2.8.1 Radicales libres

Se define como radical libre a cualquier especie química -con existencia propia- que contenga electrones desapareados en los orbitales que participan de las uniones químicas. Según la teoría atómica actual, un orbital es la región del espacio alrededor del núcleo atómico donde es mayor la probabilidad de que se encuentre un electrón. Así, cuando un orbital contiene un único electrón, se dice que ese electrón está desapareado. Los radicales libres pueden ser formados tanto por la pérdida como por la ganancia de un electrón. En el primer caso se trata de una oxidación y, en el segundo, de una reducción. También se forman radicales cuando se rompe la unión covalente entre dos átomos, de modo que los dos electrones que son compartidos por la unión se separan, quedando uno en cada átomo. Sea cual fuere el mecanismo de la formación de un radical, el electrón que queda desapareado desestabiliza al átomo, ya que aumenta su contenido energético y lo torna muy reactivo. Como la tendencia espontánea del átomo es volver al estado de menor energía, cediendo o recibiendo electrones, reacciona rápidamente con otros átomos o moléculas que se encuentren cerca.

Uno de los radicales libres que se producen normalmente en los seres vivos es el  $O_2^-$ , denominado radical superóxido, que consiste en una molécula de oxígeno que ha

adquirido un electrón adicional. Este radical libre es uno de los productos finales de la respiración celular, la cual tiene lugar en las mitocondrias. Durante dicha respiración, la mayor parte del oxígeno que llega a las mitocondrias es completamente reducido (es decir, adquiere electrones) y se transforma en agua. Sin embargo, aproximadamente un 5% del oxígeno se reduce sólo parcialmente, con la consecuente formación de radicales libres mediante un proceso en cadena, de acuerdo con las reacciones siguientes:



### 2.8.2 Compuestos antioxidantes

Un compuesto antioxidante es cualquier sustancia que cuando esté presente en bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe la oxidación de éste<sup>52</sup>. Los compuestos antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos: enzimáticos o endógenos y no enzimáticos o exógenos. Los primeros, como la catalasa o la superóxido dismutasa, reaccionan con las especies reactivas y se reciclan, por lo que solo pequeñas cantidades son necesarias para ofrecer protección. Por el contrario, los no enzimáticos actúan atrapando directamente los radicales libres y requieren de un aporte externo constante. El consumo de alimentos con propiedades antioxidantes origina un incremento del nivel de compuestos con tales propiedades en el plasma sanguíneo, lo que podría aumentar nuestras defensas frente a las reacciones de oxidación y reducir el estrés oxidativo.

En los últimos años ha aumentado de forma exponencial el interés por la búsqueda de antioxidantes de origen natural para reemplazar los antioxidantes sintéticos<sup>138</sup>. Entre estos antioxidantes naturales, merecen especial atención los péptidos de bajo peso molecular que se obtienen a partir de hidrolizados de proteínas de diferentes orígenes: uvas<sup>11</sup>, rotíferos<sup>16</sup>, leche<sup>56</sup>, atún<sup>61</sup>, hongos<sup>118</sup>, hojas de alfalfa<sup>132</sup>, extractos de té<sup>134</sup>, medusas<sup>135</sup> y sangre de ganado<sup>22, 72, 74, 112</sup>. Cuando se trata de péptidos con propiedades antioxidantes, los que tienen un tamaño inferior a 1 kDa son los que presentan mejores propiedades<sup>82, 110, 112</sup>.

Los antioxidantes, en su forma oxidada, normalmente comprenden un radical y aun podrían causar daño a las células<sup>10</sup>. Sin embargo, el organismo dispone de una red de antioxidantes que se reducen entre sí, lo que disminuye su reactividad. Este sistema puede llegar a ser insuficiente, si uno de los compuestos que forman parte de la red de antioxidantes pierde eficacia, los demás compuestos se ven perjudicados y puede originar una mayor pérdida de la protección contra las especies reactivas de lo que cabría esperar para la deficiencia de un solo antioxidante<sup>23</sup>.

El poder antioxidante de un compuesto se debe evaluar desde la base de los diferentes mecanismos implicados en la acción antioxidante. Entre ellos los más empleados y valorados son el poder de captura de radicales, poder reductor y poder quelante<sup>82</sup>.

### 2.8.2.1 Poder de captura del radical hidroxilo.

Entre los radicales del oxígeno, los radicales hidroxilo son los más reactivos, ya que pueden reaccionar con casi todas las sustancias de la célula, infringiéndoles un daño severo<sup>42</sup>. La actividad química del radical hidroxilo es muy fuerte y reacciona fácilmente con biomoléculas como aminoácidos, proteínas y el ADN<sup>61</sup>. Por tanto, la

eliminación de este compuesto tan reactivo es probablemente una de las defensas más eficaces del organismo contra las enfermedades originadas por el estrés oxidativo. En base a ello, determinar la capacidad de captura de los radicales hidroxilo por parte de los péptidos nos proporciona una información muy útil sobre la capacidad antioxidante de los mismos<sup>66</sup>.

### 2.8.2.2 Poder reductor

Se ha demostrado una relación directa entre la actividad antioxidante y el poder reductor de una molécula<sup>44</sup>. Así pues, las muestras con mayor poder reductor poseen mejores habilidades para donar electrones, los cuales serán captados por los radicales para formar especies estables, que interrumpirán las reacciones en cadena en la que participan. De este modo, la determinación del poder reductor se usa habitualmente para evaluar las capacidades antioxidantes naturales de donar electrones o hidrógenos<sup>41,43</sup>.

### 2.8.2.3 Poder quelante

Se sabe que los iones de metales de transición están implicados en muchas reacciones de oxidación de los seres vivos. Por ejemplo, los iones  $\text{Fe}^{2+}$  catalizan la reacción de Fenton, la cual transforma el peróxido de hidrógeno en radicales hidroxilo:



Estos radicales hidroxilo reaccionan rápidamente con las biomoléculas, como ya se ha descrito. Así pues, compuestos capaces de quelar los iones metálicos evitan la

generación de estrés oxidativo en la medida que eviten la reacción de Fenton, entre otras. Precisamente por esto, la medida de la capacidad quelante es otro de los parámetros importantes a la hora de evaluar la capacidad antioxidante de una sustancia<sup>52</sup>.

## **2.9 HIDRÓLISIS DE HEMOGLOBINA PURIFICADA**

### **2.9.1 Hidrólisis de proteínas**

La hidrólisis es una reacción química durante la cual se rompen moléculas de agua en cationes de hidrógeno (H<sup>+</sup>) y en aniones hidroxilo (OH<sup>-</sup>), que se unen a grupos funcionales de una molécula, lo que origina la ruptura de enlaces en la misma. En el caso concreto de las proteínas, el proceso químico de hidrólisis rompe el enlace peptídico originando péptidos y amino ácidos libres, tal como se refleja en la Figura 6. Este proceso puede ser llevado a cabo por varios mecanismos, tales como el uso de ácidos y bases fuertes, aplicación de presiones y temperaturas altas o el uso de enzimas proteolíticas.

La hidrólisis de proteínas con diferentes objetivos ha sido ampliamente estudiada desde hace varias décadas. Por ejemplo, se han utilizado péptidos desde los años 40 del siglo pasado para la suplementación dietética de individuos que no pueden procesar en su aparato digestivo las proteínas procedentes de los alimentos. Desde un punto de vista nutricional, la demanda de aminoácidos y proteínas puede ser completamente satisfecha a través de ingestas de aminoácidos libres y proteína hidrolizada. Se ha publicado en la bibliografía especializada como una alimentación a base de aminoácidos es perfectamente viable para la alimentación animal<sup>129</sup>.

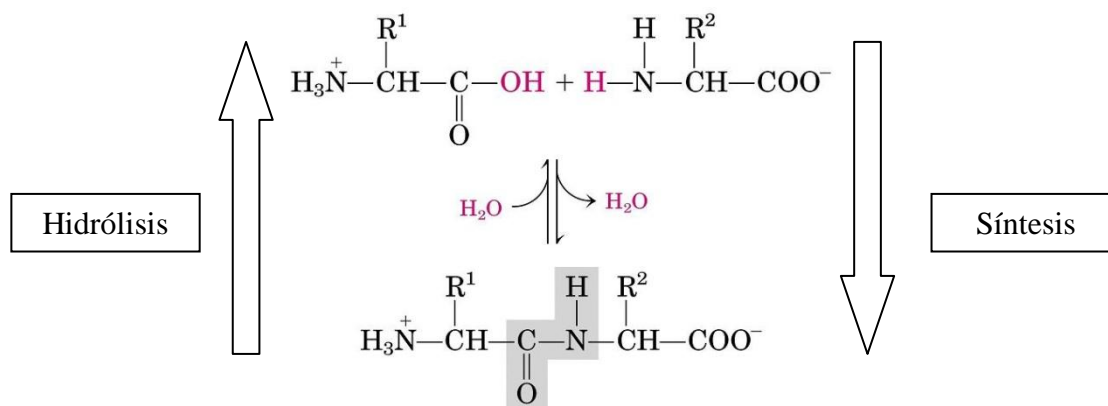


Figura 6. Formación e hidrólisis de un enlace peptídico.

Para un uso dietético, los hidrolizados de proteínas deberían ser ricos en péptidos de bajo peso molecular<sup>9, 26</sup>, especialmente di y tripéptidos y con un alto contenido de aminoácidos, para ser calificados como recurso de alto valor nutricional y con valor terapéutico<sup>124, 129</sup>. Por otro lado, péptidos de alto peso molecular (de más de 20 residuos) están supuestamente asociados con la mejora de las propiedades funcionales del hidrolizado. Debido a todas estas razones es importante caracterizar el hidrolizado según el tamaño de los péptidos que lo componen<sup>51</sup>.

Cabe señalar que los hidrolizados de proteínas tienen un amplio rango de aplicaciones como ingrediente más allá de las áreas de nutrición y de la industria alimentaria, siendo también valorados en productos dedicados a cuidados de la salud e industria cosmética<sup>77</sup>.

En principio, cualquier proteína procedente de la sangre de porcino es susceptible de ser sometida a una hidrólisis. Sin embargo, la hemoglobina se presenta como la mejor opción para este propósito por varias razones, que se detallan a continuación: es fácilmente purificada y además es la proteína mayoritaria dentro del



total de los componentes de la sangre. El resto de proteínas plasmáticas poseen por sí mismas un alto valor comercial debido a sus excelentes propiedades funcionales. Por tanto, la hemoglobina se presenta como la mejor candidata para ser extraída y sometida a un proceso de hidrólisis

La hidrólisis, además de la ya conocida función de incrementar el contenido en proteína o en aminoácidos en productos alimentarios destinados tanto para consumo humano como animal, otorga otras propiedades a las proteínas. Así, en los últimos años han aparecido múltiples estudios que han demostrado que la hemoglobina hidrolizada, empleando diferentes proteasas, produce péptidos de gran interés para la salud y la nutrición. Entre estos péptidos cabe destacar aquellos que son empleados como suplementos de hierro hémico, fácilmente asimilable por el organismo y del cual la hemoglobina es una gran fuente natural<sup>59, 121</sup> o como transportadores de hierro<sup>72</sup>. Otros autores han descrito péptidos con un marcado carácter antimicrobiano<sup>20</sup>; o que presentan propiedades antioxidantes<sup>22</sup> e incluso péptidos reguladores de la tensión arterial con una función antihipertensiva<sup>137</sup>.

Existen diferentes métodos para obtener péptidos mediante hidrólisis. En todos los trabajos mencionados en el párrafo anterior, la hidrólisis de la hemoglobina ha sido llevada a cabo mediante el uso de enzimas. Estos métodos representan un elevado coste de producción, en parte debido al precio actual de las enzimas y en parte al equipo necesario para poder tener el medio de reacción en condiciones óptimas, ya que es necesario un control estricto del pH, la temperatura y relación enzimas/sustrato<sup>111, 114, 136</sup>. Además, la cantidad de proteína procesada, que suele oscilar entre 5 y 10 mg/mL<sup>111</sup> es demasiado baja para las necesidades que plantea la industria cárnica actual.

Debido a las desventajas que presenta la hidrólisis enzimática (precio, dificultad de proceso y baja cantidad de sustrato procesado) ha surgido la idea de utilizar diferentes alternativas capaces de procesar una mayor cantidad de hemoglobina a bajo coste: hidrólisis química e hidrólisis a altas temperaturas y presiones moderadas con atmósfera controlada.

### 2.9.2 Hidrólisis química

La hidrólisis química se basa en el uso de agentes químicos de elevada acidez (ácidos sulfúrico y clorhídrico) o alcalinidad (hidróxido sódico o de bario) para romper los enlaces peptídicos y así producir péptidos. En comparación con los métodos enzimáticos, la hidrólisis química es de bajo coste, ya que los reactivos son baratos y solo se precisa llevar a cabo un control de la temperatura. Otra ventaja añadida es la gran cantidad de sustrato que se puede procesar, que oscila entre 50 y 500 mg/mL<sup>15, 49</sup>, factor a tener en cuenta debido a la gran cantidad de hemoglobina que la industria cárnica produce. Cuando estas técnicas se han empleado, se perseguía obtener aminoácidos a través de la completa hidrólisis de la proteína sustrato. En el presente trabajo, dichas condiciones han sido modificadas con el fin de obtener péptidos, ya que se persigue un menor grado de hidrólisis.

La hidrólisis ácida produce diversos efectos sobre los aminoácidos: la asparagina y glutamina son completamente hidrolizados a ácido aspártico y glutámico; y el triptófano es completamente destruido<sup>50</sup>. Por su parte, la hidrólisis básica destruye la serina, treonina, arginina y cisteína<sup>92</sup>. Esto implica que los aminoácidos perdidos en la hidrólisis ácida son conservados en la hidrólisis básica y viceversa. Es decir, una mezcla de hidrolizado ácido y básico contendría toda la variedad de aminoácidos presentes en

la proteína usada como sustrato, con lo que la calidad nutricional no se vería afectada. Este tipo de hidrólisis presenta el inconveniente de que el ácido o el álcali han de ser neutralizados, bien por dilución con agua o bien por neutralización química con la consiguiente formación de sales, que han de ser eliminadas.

Ciertas secuencias de aminoácidos son menos susceptibles de ser rotas por medio de la hidrólisis química<sup>88</sup>. Los enlaces más complicados de romper son aquellos que están formados por aminoácidos hidrofóbicos, cuyos residuos alifáticos causan interacciones estéricas que afecta tanto a la estructura terciaria como al grado de plegamiento de la proteína. Los enlaces tipo Ile-Ile, Val-Val o Ile-Val, son particularmente resistentes a la hidrólisis. La hemoglobina porcina, usada en este trabajo, es rica en aminoácidos hidrofóbicos (cerca del 60%), lo cual implica que deberían aparecer zonas con más dificultades para ser rotas que otras.

### **2.9.3 Hidrólisis a altas temperaturas y presión moderada en atmosfera controlada.**

El uso de agentes químicos como ácidos y álcalis presenta inconvenientes en el procesado posterior de los péptidos obtenidos, más allá de la degradación de ciertos aminoácidos comentada anteriormente. Así, es necesario recurrir a una neutralización del medio una vez finalizada la reacción de hidrólisis. Dicha neutralización, por su parte, provoca la formación de sales, que deben ser eliminadas con posterioridad al proceso. Además, se forman agregados de gran tamaño<sup>76</sup>, lo que dificulta el proceso global de la hidrólisis. En vista de estos inconvenientes, han ido surgiendo nuevas técnicas que tratan de paliarlos. Una de las más prometedoras y que mejores resultados ofrecen es el uso de condiciones subcríticas, es decir, someter a las proteínas a altas

presiones y temperaturas con el fin de romper sus enlaces peptídicos y obtener así amino ácidos<sup>45, 99, 131</sup>.

Varios trabajos publicados versan sobre el uso de condiciones subcríticas, en los que altas presiones hidrostáticas (HHP) que oscilan entre 200 y 800 MPa<sup>104, 123, 138</sup> son empleadas en combinación con un rango de temperaturas que oscila desde la ambiental hasta por encima de los 300°C<sup>131</sup>. Sin embargo, como ocurría con las técnicas existentes de hidrólisis química, el objetivo final de estos trabajos era la obtención de aminoácidos y no de péptidos, que es el objetivo planteado en este trabajo; por tanto se han de modificar las condiciones de presión y temperatura empleados hasta ahora.

Por otro lado, bajo estas condiciones, la hidrólisis produce compuestos de desecho, en detrimento del rendimiento del proceso. De hecho, ya en 1967 se publicó<sup>125</sup> que la degradación de aminoácidos bajo condiciones de presión y temperatura elevadas produce una gran cantidad de compuestos. Entre ellos están diferentes compuestos gaseosos como dióxido de carbono, monóxido de carbono, hidrógeno, metano; también alcanos, alqueno y alcoholes, amidas, aldehídos y ácidos carboxílicos. Otros productos que pueden ser encontrados son etanolamina u ornitina.

Las proteínas conservan su estado nativo en un estrecho rango de condiciones ambientales: pH, temperatura, presión, solventes, sales presentes, etc. Si cualquiera de estos parámetros se modifica, la proteína presente modificará su estructura nativa, dando lugar a precipitaciones, agregados o pérdida de funcionalidad

### 2.9.3.1 Efecto de la presión en la estructura de las proteínas

La presión afecta a la estructura de la proteína, tanto a la estructura secundaria, terciaria como cuaternaria; conduciendo de forma general a la desnaturalización de la misma<sup>55, 107, 116, 122, 123</sup>; pero sin modificar su tamaño molecular<sup>98</sup>. Esto significa que la

presión no es capaz de romper los enlaces peptídicos por sí misma y, por tanto, de hidrolizar las proteínas.

La presión actúa como un factor físico-químico que desequilibra las interacciones intramoleculares. Como norma general, la estructura cuaternaria está mantenida por interacciones hidrofóbicas, que son las más sensibles a la presión. Una presión moderada (menos de 150 MPa) puede originar la disociación de proteínas oligoméricas<sup>105</sup>, la cual puede ser seguida por precipitación o por agregación de las subunidades. Presiones de entre 150-200 MPa inducen a la desnaturalización de las proteínas y a una reasociación de las subunidades. Por encima de los 200 MPa se producen cambios significativos en la estructura terciaria. No obstante, estos cambios pueden ser reversibles incluso a presiones aun más altas (400-800 MPa). La estructura secundaria solo se ve afectada a presiones muy altas, por encima de los 300-700 MPa<sup>7</sup> según la proteína que se trate, dando lugar a modificaciones espaciales no reversibles. Estas modificaciones provocan que enlaces peptídicos y residuos de aminoácidos orientados hacia el interior pasen a encontrarse expuestos a la actividad de enzimas y otros agentes capaces de hidrolizar enlaces peptídicos.

Trabajos recientes<sup>117</sup> contemplan el uso de métodos combinados de HHP y sistemas enzimáticos para obtener péptidos a partir de la hemoglobina, los resultados obtenidos fueron mejores que los ofrecidos por ambos sistemas por separado. Esto es debido a que las altas presiones desnaturalizan la proteína y permiten el acceso de las enzimas empleadas a más dianas<sup>91</sup>, las cuales están ocultas en condiciones nativas de la proteína sustrato.

### 2.9.3.2 Efecto de la temperatura en la estructura de las proteínas

Cuando una proteína en estado nativo es sometida a un tratamiento térmico se producen cambios a nivel estructural que conllevan la pérdida de su conformación nativa. De forma general, la desnaturalización de las proteínas es reversible siempre que la cadena peptídica siga con cierto grado de plegamiento, de tal modo que si éste se elimina, volvería su estado nativo. Por el contrario, suele ser irreversible si la cadena peptídica desplegada se estabiliza por interacción intermolecular con otras cadenas peptídicas como ocurre, por ejemplo, con la coagulación térmica que conduce a la formación de geles o precipitados. Esta nueva estructura está estabilizada por puentes disulfuro. Este proceso, habitualmente, conlleva la pérdida de la actividad biológica que anteriormente hubieran presentado.

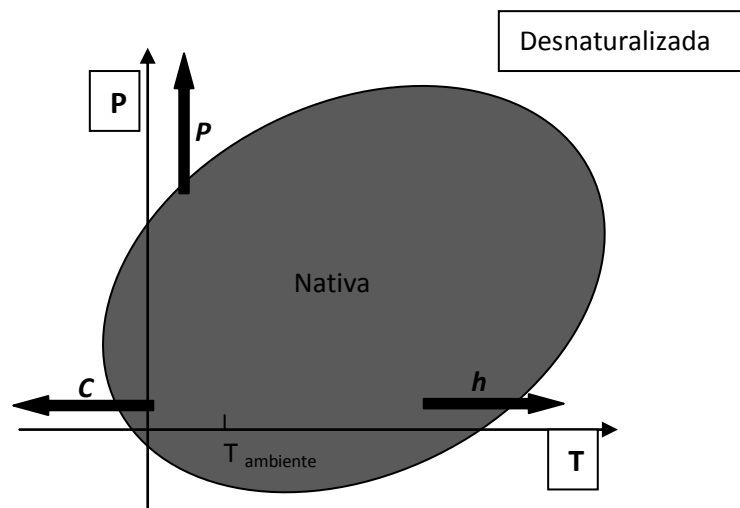
Por tanto, a presión ambiental, el uso de altas temperaturas conduce a la desnaturalización de las proteínas; hecho que se va acentuando con el incremento de la temperatura o con un mayor tiempo de exposición a una temperatura dada.

### 2.9.3.3 Efecto combinado de P/T sobre la estructura de las proteínas

Los efectos de la presión sobre las proteínas responden al principio de Le Châtelier así como al principio de la Ordenación Microscópica. El primer principio postula que si un sistema químico en equilibrio experimenta un cambio en la concentración, temperatura, volumen o la presión parcial, entonces el equilibrio se desplaza para contrarrestar el cambio impuesto. El principio de Ordenación Microscópica, por su parte, implica que un incremento de la presión a temperatura constante aumenta el grado de ordenación de las moléculas, resultando en un descenso de la entropía del sistema. Estudios acerca de la relación presión-temperatura y su efecto

sobre las proteínas, han demostrado un efecto antagonista de estos dos factores físicos<sup>107</sup>.

El diagrama de fases de la desnaturalización de proteínas<sup>107</sup>, mostrado en la Figura 7, representa la región estable de la estructura nativa de las proteínas. Este diagrama está muy simplificado ya que solo tiene en cuenta dos estados: nativo y desnaturalizado; mientras que se sabe que este proceso tiene multitud de intermediarios que en este caso no han sido tenidos en cuenta. De él se puede deducir el comportamiento observado<sup>55</sup> de que a bajas temperaturas la presión a la que las proteínas se desnaturalizan es menor que a altas temperaturas.



*Figura 7. Representación esquemática del diagrama de fases elíptico de las proteínas. Las flechas marcadas con las letras h, c y p muestran las vías específicas de desnaturalización conocidas por presión, calor y congelación<sup>107</sup>.*

El desdoblamiento de la proteína ocasiona que se presenten múltiples puntos de ruptura y se expongan al agente hidrolizante presente en el medio. Por tanto, enlaces peptídicos que antes eran protegidos por la estructura tridimensional de la proteína

ahora son susceptibles de ser atacados. Estos mecanismos son dependientes de la temperatura, de modo que, a mayores temperaturas más rápido se produce la hidrólisis debido a un doble efecto: aumenta de la cinética química de la reacción de hidrólisis y un mayor grado de desnaturalización, lo que favorece la ruptura de mayor número de enlaces.

### **2.9.4 Diferencias entre las técnicas de hidrólisis**

Este apartado tiene como objetivo resumir las ventajas e inconvenientes de los métodos empleados para hidrolizar las proteínas que se aplican actualmente, los cuales se reflejan en la Tabla 9.

Como se puede observar, el mayor inconveniente ofrecido por los métodos enzimáticos es el alto coste de reactivos y operacionales, unidos a una baja cantidad de sustrato procesado. Sin embargo, presenta el atractivo de ser un proceso muy específico y reproducible.

El uso de ácidos y bases es aplicable a altas cantidades de sustrato; sin embargo, el procesado posterior, que incluye neutralización y desalación, alarga los tiempos de procesado. Por último, el uso de una hidrólisis física, permite manipular elevadas cantidades de sustrato en tiempos cortos, con un alto rendimiento.



*Tabla 9. Comparación entre hidrólisis química, física y enzimática.*

<b>Hidrólisis por enzimas</b>	<b>Hidrólisis química</b>	<b>Hidrólisis física</b>
Las proteínas se rompen en dianas, productos predecibles	La hidrólisis tiene lugar principalmente en los extremos de las proteínas	Completa degradación del sustrato con control del tamaño final
Se deben inactivar las enzimas	Después de la neutralización se requiere eliminar la sal producida	No requiere pasos posteriores
No hay degradación de aminoácidos	Degradación de determinados aminoácidos según el medio empleado	Los aminoácidos se degradan a compuestos de desecho
Las enzimas son un material muy caro	Los reactivos son muy baratos	Solo se emplea gas como reactivo para conseguir altas presiones
Condiciones del medio muy controladas (pH, temperatura, etc)	Solo exige control de temperatura	Se requiere control de temperatura y presión
Sólo aplicable a pequeñas cantidades de sustrato	Se pueden procesar grandes cantidades de sustrato	Se pueden procesar concentraciones elevadas de proteínas
Tiempo medio de hidrólisis, según el DH deseado (2 a 12 horas)	Tiempos de hidrólisis moderados, según la temperatura empleada (6 a 24 horas)	Tiempos bajos de reacción, entre 4 y 6 horas

### *3.- Material y Métodos*



### 3.1 OBTENCIÓN DE SANGRE

Es necesario indicar que todas las operaciones de manipulación de la sangre (anticoagulantes, antisépticos, centrifugación, etc.) deben realizarse en el menor espacio de tiempo posible a partir de su recogida, para evitar su deterioro. La sangre y sus fracciones son fluidos muy complejos con una gran diversidad de compuestos. Las proteínas en este medio pueden sufrir transformaciones tales como hidrólisis, desnaturalización, precipitación, polimerización, unión de unas con otras, etc. Cualquier variación de temperatura, pH, fuerza iónica, desarrollo de microorganismos, etc., provocan variaciones irreversibles con el paso del tiempo que dan lugar a un distanciamiento de las propiedades y composiciones del fluido inicial.

En primer lugar es muy importante la recogida higiénica de la sangre con el fin de evitar la contaminación microbiana, que por un lado puede biodegradar este medio, hidrolizando las proteínas que se pretenden obtener íntegras. La sangre utilizada para este trabajo fue recolectada directamente de cabezas de porcino recién sacrificadas. Los animales fueron sacrificados en el matadero Junquera-Bobes, situado en el concejo de Noreña en Asturias (España). La recolección de la sangre se hizo sobre una disolución de citrato sódico, con una proporción final del 2% p/v sobre el volumen total recolectado. El citrato sódico actúa como un secuestrador de iones de calcio, indispensables para el proceso de coagulación y por tanto ese proceso es inhibido. La sangre fue refrigerada en el menor plazo de tiempo posible y así mantenida hasta su posterior procesamiento.

### **3.2 SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES LÍQUIDA Y SÓLIDA**

Una vez recolectada la sangre, refrigerada y tratada para evitar su coagulación, para obtener las proteínas presentes en este tejido hay que llevar a cabo la separación de las dos fases que componen la sangre, plasma y células, para tratarlas por separado. La técnica utilizada para separar estas fracciones fue la centrifugación a una temperatura de unos 4-10°C<sup>31</sup>. Existen otras alternativas a esta técnica, como la decantación o la filtración, pero en ningún caso consiguen la eficacia y la preservación de las condiciones de ambas fases como con la centrifugación. Así pues, esta fue la técnica empleada para separar plasma y fracción celular. Para ello se empleó una centrifuga Kubota 6700, en la cual alícuotas de sangre eran centrifugadas durante 10 minutos a 10000 g. de fuerza. A continuación se obtenían dos fases bien diferenciadas (plasma y células rojas) las cuales eran separadas por decantación manual, se obtenía un rendimiento medio de un 60% de plasma y un 40% de fracción celular. Cada una de las fases así obtenidas era refrigerada hasta su uso a 4 °C.

### **3.3 FRACCIONAMIENTO DEL PLASMA**

Para la separación de las proteínas procedentes del plasma sanguíneo se recurrió a una modificación de la técnica de Cohn<sup>28</sup> desarrollada previamente en este laboratorio<sup>83</sup>. El diagrama de flujo de dicho proceso es el que se muestra en la Figura 8. Durante todo el proceso de fraccionamiento químico, se mantuvo una temperatura cercana a 0 °C, para ello se introdujo el recipiente en un baño de hielo hasta el fin del proceso. La refrigeración es importante pues contrarresta los efectos desnaturalizantes del etanol empleado para fraccionar las proteínas plasmáticas.

En primer lugar el plasma se diluyó en un volumen equivalente de agua destilada, así se reducía la concentración de proteínas y se mejoraba la calidad de la separación. El etanol era agregado gota a gota a la disolución proteica hasta la concentración deseada y posteriormente se dejaba equilibrar durante 30 minutos. Pasado este tiempo la disolución de plasma se centrifugaba a 10.000 g durante 10 minutos (Kubota 6700) y se obtenía un precipitado y un sobrenadante. El precipitado era resuspendido en un tampón fosfato a pH=7.6, 0.1M y el sobrenadante era sometido al siguiente paso de fraccionamiento.

Las fracciones así obtenidas fueron 4, las cuales han sido denominadas FI, FII, FIII y FIV. Éstas estaban compuestas principalmente por fibrinógeno;  $\gamma$ -globulinas;  $\alpha$  y  $\beta$ -globulinas y albúmina sérica respectivamente.

Las fracciones, una vez separadas y resuspendidas, fueron liofilizadas en un equipo Telstar Cryostar y almacenadas a -20 °C hasta el momento de su análisis.

### 3.- Material y métodos

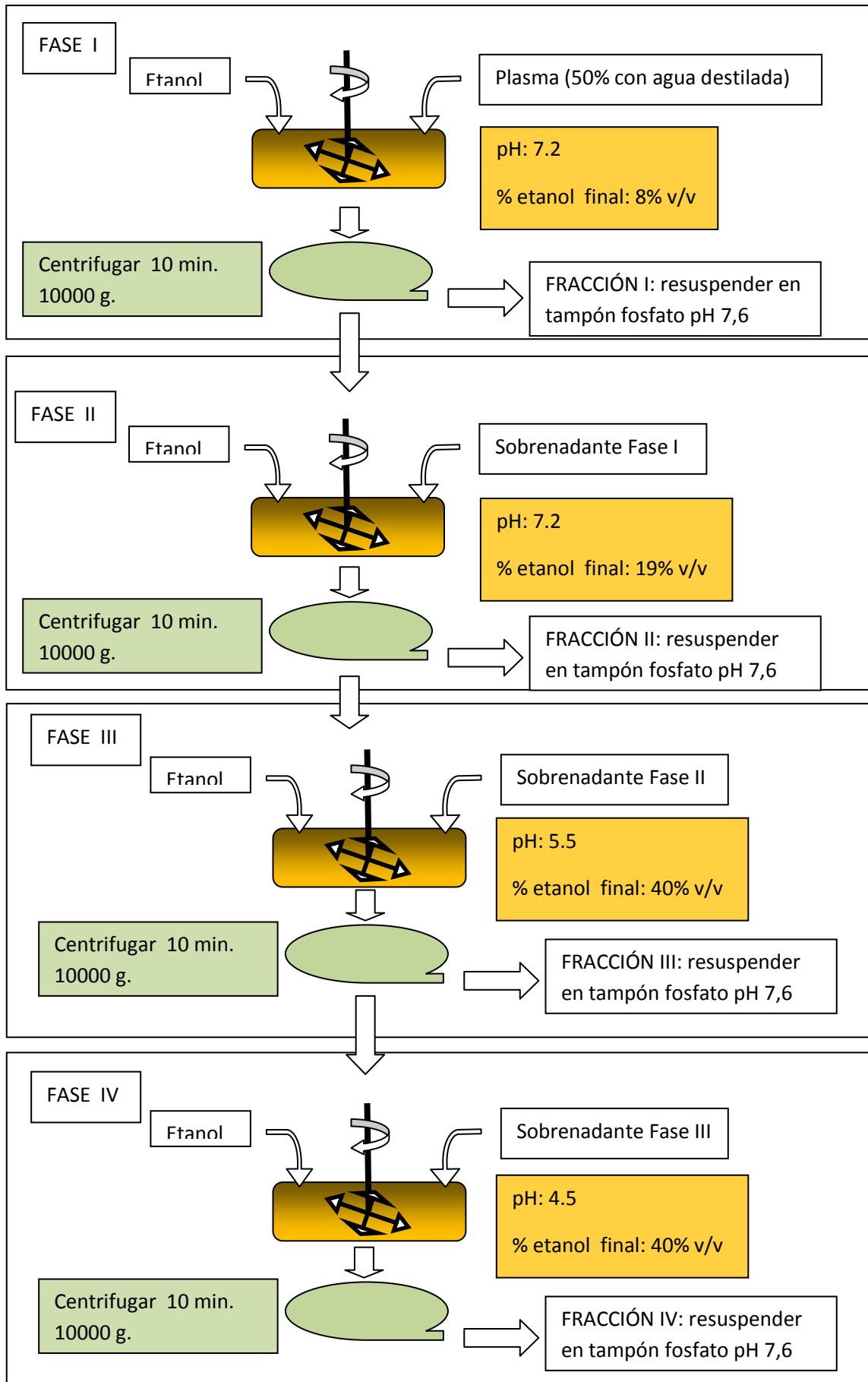


Figura 8. Diagrama de flujo para el fraccionamiento del plasma de cerdo.

### **3.4 PURIFICACIÓN DE LA HEMOGLOBINA**

La segunda fracción de la sangre está constituida principalmente por glóbulos rojos, que en esencia no son más que células formadas únicamente por una membrana plasmática que contienen la hemoglobina. Para extraer la hemoglobina se rompen primero los hematíes por medio de choque osmótico; esto se conseguía agregando un volumen equivalente de agua destilada al concentrado celular. Con esto se originaba la formación de poros en la membrana plasmática por los que sale la hemoglobina al exterior. Durante este proceso la mezcla era mantenida en una suave agitación.

La siguiente fase es la eliminación de las membranas plasmáticas, para lograrlo se agregaba un solvente orgánico a la mezcla, en este caso cloroformo en una proporción de 1/4 v/v (cloroformo/disolución total). El cloroformo no es miscible con el agua y es capaz de arrastrar las membranas plasmáticas y así separarlas de la hemoglobina disuelta en agua. La mezcla era mantenida en agitación suave para favorecer el contacto entre el cloroformo y las membranas plasmáticas. Después se dejaba reposar uno o dos minutos y a continuación se centrifugaba durante 10 minutos con una fuerza de 10.000 g. en una centrífuga Kubota 6700. Al final del proceso se obtenía un sobrenadante formado por agua y hemoglobina disuelta y un precipitado formado por cloroformo emulsionado con las membranas plasmáticas. Por último, la disolución de hemoglobina era liofilizada (Telstar Criodos) y almacenada a -20 °C hasta su posterior utilización.

#### **3.4.1 Globina precipitada**

A partir de la disolución de hemoglobina obtenida tras retirar las membranas plasmáticas o de la hemoglobina liofilizada se pueden obtener dos derivados: globina precipitada y globina precipitada decolorada.



#### 3.4.1.1 Globina precipitada coloreada

En este trabajo se utilizó acetona para llevar a cabo la precipitación. La acetona produce un cierto grado de desnaturalización sobre la globina al separar las cadenas polipeptídicas reduciendo la afinidad de la proteína por el grupo hemo. Así, se logra que precipite la proteína y que el grupo hemo, con la mayor parte del hierro de esta fracción, permanezca en disolución.

La disolución de hemoglobina-agua era adicionada gota a gota sobre un volumen de acetona en constante agitación y cuyo pH se había fijado en un valor de 2.5 con ayuda de ácido clorhídrico 1M. El volumen de acetona empleado era cuatro veces el volumen inicial de la disolución de hemoglobina. Una vez finalizada la adición el precipitado obtenido era separado por filtración y posteriormente lavado varias veces con agua para eliminar restos del solvente orgánico.

Este proceso fue realizado a temperatura ambiente y una vez finalizado se secaba a 40-45°C para su posterior almacenamiento y uso.

#### 3.4.1.2 Globina precipitada decolorada

El proceso empleado es idéntico al relatado en el apartado 3.4.1.1, con la salvedad de que la disolución de acetona estaba formada por un 10% de agua oxigenada de 100 volúmenes. El peróxido de hidrógeno actúa rompiendo el grupo hemo, con lo que ayuda a la separación, y oxida el hierro (II) a hierro (III) produciéndose así, la decoloración.

Una vez separada la globina decolorada de la disolución de acetona/peróxido de hidrógeno se filtraba y se lavaba, como en el método anterior, pero se realizaba un paso adicional de eliminación enzimática del agua oxigenada. Para ello se creaba una disolución donde la concentración del enzima (catalasa de grado alimentario) es del

0.25% con respecto a la masa de globina decolorada. La enzima se dejaba actuar durante 30 minutos y el producto era filtrado de nuevo y secado como en el caso anterior.

### **3.5 CONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS CON DEXTRANO**

El hidrato de carbono empleado para conjugar la hemoglobina fue dextrano de 10 kDa producido por *Leuconostoc sp.* (SIGMA). Las proteínas liofilizadas fueron disueltas en un tampón fosfato (0.1 M y pH=7.6) y a continuación se le agregó dextrano en una proporción peso/peso de 1:3 proteína/dextrano. Dicha proporción fue elegida ya que ha sido referenciado<sup>62</sup> como la proporción que mejor rendimiento producía a la hora de conjugar BSA con dextrano. La disolución de proteína/dextrano fue posteriormente liofilizada (Telstar Cryodos) para obtener una mezcla homogénea de ambos compuestos. A continuación cuatro gramos de la mezcla fueron colocados en recipientes de vidrio herméticos y luego calentados a 70, 75 y 80°C para determinar la influencia de la temperatura en el proceso de conjugación. Este rango de temperaturas fue elegido en base a investigaciones previas, las cuales confirmaron que a 60°C son necesarias 24 horas para obtener un alto grado de conjugación<sup>63</sup>, mientras que tan solo 2 horas fueron necesarias a 80°C<sup>1</sup>. Se tomaban muestras a intervalos regulares de tiempo para seguir la evolución del proceso.

### **3.6 HIDRÓLISIS DE HEMOGLOBINA**

La hemoglobina purificada y posteriormente liofilizada fue utilizada como sustrato para realizar los hidrolizados con dos técnicas diferentes: hidrólisis química e hidrólisis física

### 3.6.1 Hidrólisis química

La hidrólisis fue realizada bajo diferentes condiciones de temperatura (50 y 80°C) y diversas composiciones del medio empleando hidróxido sódico y ácido sulfúrico o clorhídrico a diferentes concentraciones. En la Tabla 10 se muestran las condiciones ensayadas en este trabajo.

*Tabla 10. Medios de hidrólisis química empleados.*

<b>Agente</b>	<b>Ácido sulfúrico</b>	<b>Ácido clorhídrico</b>	<b>Hidróxido sódico</b>
9 molar	NO	NO	SI
6 molar	SI	SI	SI
3 molar	SI	SI	SI
1 molar	SI	NO	NO

La hidrólisis tenía lugar en un reactor encamisado conectado a un baño con control de temperatura para poder controlar la temperatura de la reacción, mientras que un rotor mantenía el medio en constante agitación. Las temperaturas ensayadas fueron de 50 y 80 °C. Un esquema del dispositivo utilizado se muestra en la siguiente figura.



*Figura 9. Reactor empleado para la hidrólisis química.*

El volumen de reacción empleado fue en todos los casos de 200 mL. La hemoglobina fue pesada para obtener una concentración total de 50 mg/mL. La hemoglobina se disolvía en agua destilada y se introducía en el reactor, a la vez que la agitación magnética era activada. Cuando la temperatura de trabajo era alcanzada se agregaba lentamente el álcali o el ácido hasta completar los 200 mL finales. Se tuvo la precaución de disolver la hemoglobina previamente en agua destilada, con una leve agitación hasta su total disolución. Esta cantidad de agua era calculada en base a la concentración de las disoluciones madre de los ácidos o de la base, para que una vez alcanzada la temperatura de trabajo y al agregar la cantidad correspondiente del agente hidrolizante se obtuviera la concentración final deseada de hemoglobina y de ácido o álcali. Es decir, si usamos un ácido 18M como solución madre y queremos realizar una hidrólisis 6 molar, la hemoglobina era disuelta en un volumen de 134 mL de agua; por

el contrario si la hidrólisis a realizar es de 3 M, la hemoglobina era disuelta en 167 mL de agua, completando el volumen final con la disolución madre de ácido.

De cada experimento se tomaban muestras a diversos tiempos, la hidrólisis era detenida en las muestras neutralizando el ácido o la base con la correspondiente disolución neutralizadora. La muestra se ajustaba a un pH final de 7-7.5. Todos los experimentos tuvieron una duración de 48 horas.

#### **3.6.2 Eliminación de las sales**

Debido a la neutralización del ácido o la base tras el proceso de hidrólisis se formaba una gran cantidad de sales, que deben ser eliminadas. La sal formada bien puede ser NaCl (en el caso de la hidrólisis con HCl) o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (hidrólisis con NaOH o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); en este último caso la sal puede ser eliminada mediante una extracción en frío. La solubilidad del sulfato sódico es mínima a una temperatura de 4°C. Por tanto, las muestras recogidas y neutralizadas, eran enfriadas hasta los 4°C; con esto se conseguía la precipitación de las sales, que pueden ser fácilmente separados por centrifugación durante 5 minutos a 5000 g, en una Kubota 6700, y posterior decantación. Debido a que las sales retenían parte de los péptidos y aminoácidos hidrolizados se realizó una extracción en frío con agua destilada. Al precipitado de sales obtenido se le agregaba agua a 2-4°C y era agitada suavemente manteniendo la temperatura de la mezcla por debajo de los 4°C. A los 5 minutos se realizaba a una nueva centrifugación (bajo las mismas condiciones que antes) y se decantaba de nuevo el sobrenadante. Con el precipitado obtenido se repetía el proceso dos veces más.

Para comprobar la reducción de la presencia de sales se hicieron mediciones de los iones sulfato en un equipo de cromatografía de intercambio iónico. El buffer

empleado estaba compuesto por bicarbonato sódico (1.8 mM) y carbonato sódico (1.7 mM). El equipo empleado fue un Dionex DX-120, con una columna IonPack AS4A-SC, una precolumna IonPack AG4A-SC y un supresor ASRS-UltraII 4 mm (Dionex). La muestra fue diluida y filtrada a través de un poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , y finalmente eluída a 1 mL/min. Se realizó un calibrado de sulfato sódico, dentro de un rango de concentraciones de 5 a 100 ppm ( $R^2 = 0.99$ ).

#### 3.6.3 Hidrólisis física

La hemoglobina liofilizada fue diluida en agua destilada hasta una concentración final de 50 mg/mL, la misma que había sido empleada para la hidrólisis química. En este caso el volumen de reacción fue de 400 mL. Esta disolución fue colocada en un reactor del cual se indica un esquema en la Figura 10.

El reactor constaba de una fuente de gas purificado, oxígeno o nitrógeno según el que se vaya a emplear. Este gas era conducido hacía un humidificador dónde se ponía en contacto con vapor de agua que estaba a la misma temperatura que la hemoglobina en disolución en el interior del reactor. El objetivo era por un lado evitar que entrara gas sin humedecer y arrastrara vapor de agua de la muestra (reduciendo el volumen de reacción) y por otro evitar un descenso de la temperatura.

A continuación el aire precalentado y humidificado se introducía en el interior del reactor a un flujo de 1000 mL/min, controlado por una electroválvula de precisión (BROOKS mass flow controller 5850). El gas se inyectaba hasta que se alcanzaba una presión de 40 atmósferas (4 MPa), momento en el cual una válvula de seguridad permitía salir el gas excedente para mantener la presión constante. El gas desalojado era obligado a pasar por un borboteador en el que había una disolución ácida para retener

los compuestos de amonio formados durante la reacción, que posteriormente serían cuantificados.

La temperatura interna del reactor se midió a través de un termopar que controla las resistencias eléctricas del encamisado. Las temperaturas que se probaron fueron de 120, 150 y 180°C. El sistema estaba equipado con un agitador mecánico, su velocidad se fijó en 250 rpm para todos los experimentos. Una válvula permitía recoger muestras en los tiempos establecidos, las cuales eran extraídas a través de una espiral de vidrio refrigerada por agua para enfriarlas rápidamente.

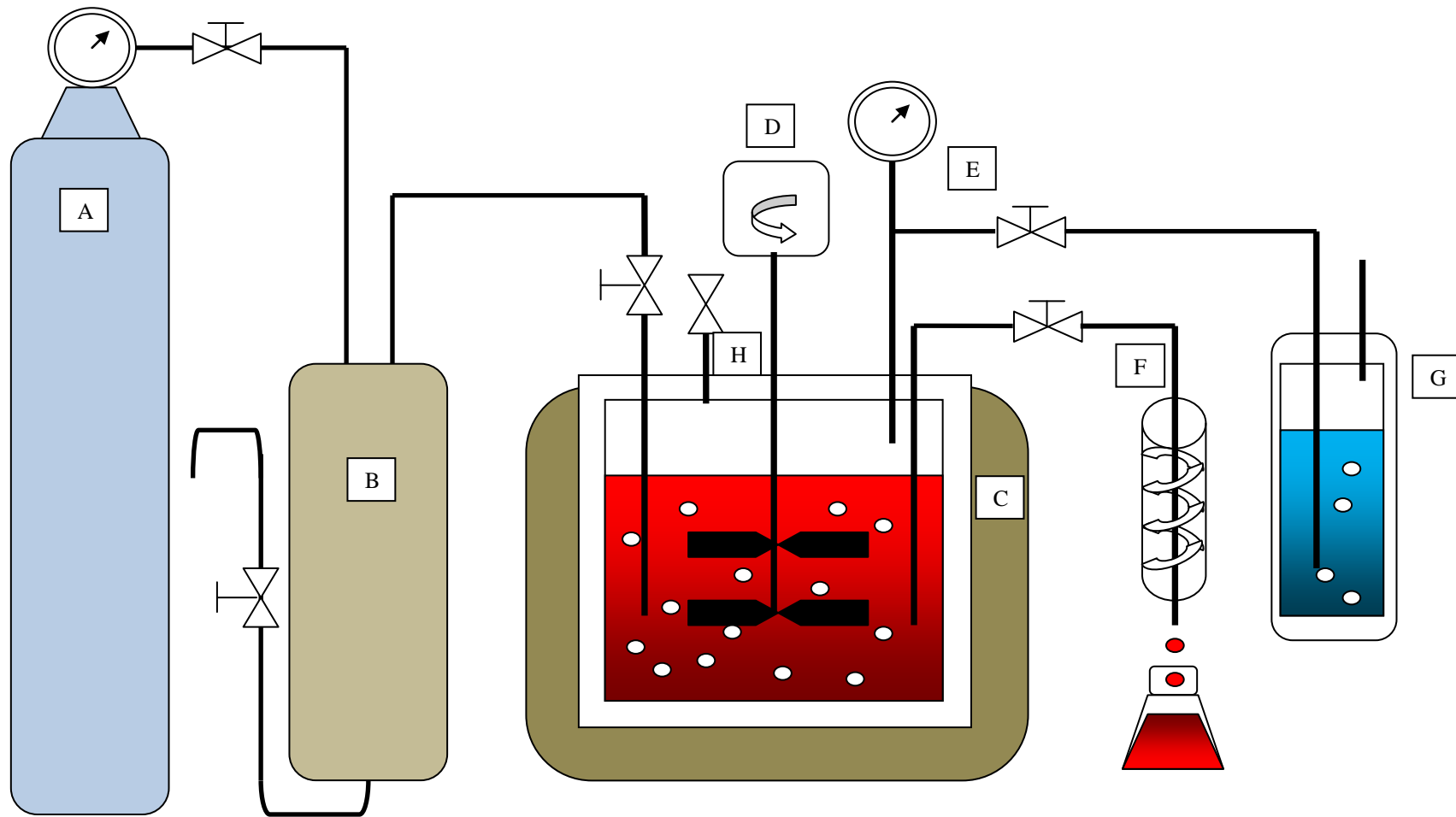


Figura 10. Esquema del reactor empleado en la hidrólisis de hemoglobina. A: depósito de aire a presión. B: humidificador. C: Camisa del reactor termostatzada. D: rotor. E: válvula de control de la presión. F: enfriador de la muestra. G: borboteador. H: válvula de seguridad.



### **3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS**

Después de relatar los métodos de separación y purificación de las proteínas sanguíneas, de producción de los conjugados e hidrolizados, se recogen los métodos analíticos empleados para analizar los resultados obtenidos.

#### **3.7.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Para la determinación de las proteínas presentes en la sangre, el plasma y comprobar la pureza de la hemoglobina extraída, así como comprobar que tras el proceso de Maillard se han formado glicoproteínas se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida. Se siguió el protocolo desarrollado por Laemmli<sup>69</sup>. El equipo utilizado fue el Mini-Protean II slab cell de la marca Bio-Rad y los geles contenían un 12% de acrilamida/bis-acrilamida.

Los geles obtenidos fueron teñidos usando diferentes colorantes. En primer lugar se empleó azul de Comassie para revelar la proteína total. En segundo lugar se usó una tinción específica de glicoproteínas para el seguimiento de la conjugación con dextrano, para ello se aplicó el Glycoprotein Staining Kit de Pierce Biotechnology.

#### **3.7.2 Medida de propiedades funcionales**

Las propiedades funcionales de cada una de las proteínas de interés en su estado nativo, así como de los conjugados obtenidos a partir de ellas y de los péptidos procedentes de la hemoglobina fueron medidas con los métodos que se indican a continuación.

#### 3.7.2.1 Método de Lowry

Se utilizó para la determinación cuantitativa de proteínas. Está basado en que los enlaces peptídicos de las proteínas, en condiciones alcalinas, forman un complejo con el  $\text{Cu}^{2+}$  y lo reducen a  $\text{Cu}^+$ . El  $\text{Cu}^+$  y los aminoácidos triptófano y cisteína de las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin para dar una coloración azul, cuya intensidad variará dependiendo del contenido en triptófano y cisteína de la muestra.

Las soluciones que se emplearon para llevar a cabo esta cuantificación proteica fueron:

- Solución A: 10 gramos de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 2 gramos de  $\text{NaOH}$  en 500 mL de agua destilada.
- Solución B1: 1 gramo de  $\text{CuSO}_4$  en 100 mL de agua destilada.
- Solución B2: 2 gramos de tartrato sódico-potásico en 100 mL de agua, éste se prepara siempre antes de su uso inmediato.
- Solución C: 98 mL de A + 1 mL de B1 + 1 mL de B2.
- Reactivo de Folin: diluido con agua estéril en proporción 1:1.

Sobre 1 mL de muestra se añadían 5 mL del reactivo C (cobre alcalino), a continuación se agitaba la mezcla y se dejaba reaccionar durante 10 minutos, posteriormente se agregaban 0.3 mL del reactivo de Folin diluido en agua (1:1, v/v), se agitaba y se dejaba reposar durante 30 minutos. Por último la absorbancia era medida en un espectrofotómetro (en este caso un Thermo Scientific, Helios  $\gamma$  UV-Visible) a una longitud de onda de 500 nm. Se realizó una curva de calibrado con albúmina disuelta en

agua destilada a concentraciones que van de 10 a 500 ppm. Con esta curva se obtenía la relación entre absorbancia y concentración.

#### 3.7.2.2 Determinación de la solubilidad.

La solubilidad proteica de las muestras era determinada siguiendo el método de De Vouno<sup>33</sup>, para lo cual 0.5 gramos de muestra eran disueltos en 10 mL de agua destilada, se ajustaban las diferentes muestras a varios pH, comprendidos entre los valores de 3 y 8, añadiendo para ello NaOH o HCl 0.1 N. La disolución era agitada durante 30 minutos a 6000 rpm en una centrífuga KUBOTA Modelo 6700. La cantidad de proteína soluble fue determinada usando el método de Lowry y se expresaba como el porcentaje de la originalmente puesta en la disolución.

En los péptidos la medida de la concentración de los mismos antes y después de la centrifugación fue realizada a través de espectrofotometría de ultra violeta (Thermo Scientific, Helios  $\gamma$  UV-Visible). El método de Lowry presentaba interferencias debido al bajo peso de los péptidos obtenidos. Para ello se utilizó una longitud de onda de 214 nm, a la cual el enlace peptídico posee un máximo de absorbancia. Así pues, siguiendo la siguiente fórmula se cuantificó la solubilidad de los péptidos:

$$\%S = \frac{V_f}{V_i} * 100 \quad (3.1)$$

Dónde  $V_i$  es la cantidad de proteína determinada antes de la centrifugación (bien por el método de Lowry o por absorbancia) y  $V_f$  es la concentración proteica determinada tras la centrifugación.

#### 3.7.2.3 Determinación de las propiedades emulsificantes.

La capacidad emulsificante se determinó siguiendo el método de Inklar y Fourtain<sup>60</sup>. Consistía en disolver diferentes cantidades de proteína (entre 20 y 100 mg) en 10 mL de una solución de NaCl al 0,075%, (el cloruro sódico aumenta la capacidad emulsionante de las proteínas al provocar el desdoblamiento de la red proteica). A esta disolución se le agregaban 13 ml de aceite de semilla de algodón. La mezcla era agitada durante 15 minutos y a continuación se iba a 3000 rpm en una centrífuga, KUBOTA Modelo 6700, durante 10 minutos. El aceite no emulsionado era separado y su volumen era medido. Por diferencia del recuperado con el añadido se calculó el porcentaje de emulsificación de la siguiente manera:

$$\%E = \frac{V_e}{V_a} * 100 \quad (3.2)$$

Donde:

E: % de emulsificación.

Ve: volumen de aceite emulsionado.

Va: volumen aceite añadido.

#### 3.7.2.4 Determinación de las propiedades espumantes

La capacidad espumante era evaluada usando el protocolo de Tybor<sup>120</sup>, para ello se disolvieron 0.17 g de muestra en 10 mL de H<sub>2</sub>O, concentración de proteína a la cual se forman los mayores volúmenes de espuma según este autor. La disolución era ajustada a diferentes valores de pH (entre 2 y 10). La espuma era formada agitando as dispersión a 1000 rpm en un agitador magnético Selecta durante 10 minutos. El

volumen específico de la espuma fue medido experimentalmente en una probeta, la estabilidad era determinada midiendo la disminución del volumen de espuma en el tiempo, a los 5, 10 y 15 minutos. El resultado era expresado como porcentaje del volumen de la espuma formada con respecto al volumen total.

#### 3.7.2.5 Concentración mínima de gelificación (LGC)

Para determinar el parámetro LGC eran preparadas disoluciones de la muestra a diferentes porcentajes (p/v) en 5 mL de agua destilada<sup>27</sup>. Estas preparaciones eran sumergidas en un baño de agua a 100°C en el que permanecía 30 minutos, una vez transcurrido este tiempo las muestras eran transferidas a un baño de hielo, en el que permanecían otra hora. El LGC era determinado como la concentración mínima de muestra en la cual el gel que se formaba no se deslizaba en el tubo invertido.

#### 3.7.2.6 Temperatura de gelificación

La temperatura de gelificación (T<sub>gel</sub>) fue determinada mediante métodos reológicos. Se preparaban suspensiones de proteínas (10% p/v) y después eran ajustadas a pH=6 con ácido clorhídrico o sosa 1 molar<sup>31</sup>.

Las medidas fueron realizadas en un reómetro Haake MARS. Las muestras eran colocadas en un sistema de medida plato-plato, con una separación entre ellos de 1 mm. Las muestras eran cubiertas con aceite mineral para evitar la desecación de la muestra durante el calentamiento. La deformación ( $\gamma$ ) fue fijada al 1% y la frecuencia de oscilación en 1 rad/seg. La suspensión proteica fue sometida a una rampa de temperatura de 2°C/min, desde una temperatura inicial de 20°C hasta una final de 90°C.

A continuación, la muestra era sometida a una rampa de enfriamiento de 2°C/min hasta alcanzar la temperatura ambiental.

Durante el ensayo, los datos obtenidos para las variables del módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ) eran monitorizados; se consideraba que se alcanzaba el Tgel cuando los dos módulos cruzaban sus valores en el gráfico esfuerzo/temperatura<sup>71</sup>. Si este cruce de líneas no tenía lugar, se podía considerar que el Tgel era aquel en que los módulos alcanzaban un valor superior a 1 pascal.

#### 3.7.2.7 Color de los hidrolizados

Fue evaluada la pérdida de color de la disolución original de hemoglobina, con respecto al producto final formado por péptidos y aminoácidos. Se partía de disoluciones de 5 mg/mL de los péptidos y de la hemoglobina, a partir de éstas se realizaba una dilución 1:50 en agua destilada. La absorbancia de dichas diluciones fue medida (Thermo Scientific, Helios  $\gamma$  UV-Visible) a 407 nm<sup>117</sup>, posteriormente se evaluó la pérdida de color siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ pérdida de color} = \left[ \frac{A_1}{A_0} \right] \times 100 \quad (3.3)$$

En la cual  $A_1$  corresponde a la absorbancia de los péptidos y  $A_0$  al de la hemoglobina.

### **3.7.3 Nivel de conjugación de proteína/dextrano**

El nivel de conjugación de las proteínas fue evaluado a través del método del TNBS (ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico) desarrollado por Fields<sup>48</sup>, el cual valora el número de grupos libres presentes en una disolución. El descenso de estos grupos amino a lo largo del tratamiento térmico era indicativo del nivel de conjugación conseguido.

A una alícuota de muestra de 0.5 mL se le añaden 0.5 mL de tampón de borato potásico (pH 9.1) y 20 µl de TNBS 1.8 molar. La mezcla era mantenida a temperatura ambiente durante 5 minutos. Pasado este tiempo la reacción era detenida agregando 2 mL de tampón fosfato (0.1 M fosfato sódico monobásico, 1.5 mM sulfito sódico). El color resultante era medido en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm (Thermo Scientific, Helios γ UV-Visible). Se realizó una curva patrón con glicina para la calibración del método, en un rango de 0.21 a 2.1 µM.

### **3.7.4 DSC: calorimetría diferencial de barrido**

Los ensayos de DSC fueron llevados a cabo en tubos de aluminio herméticamente sellados. El equipo empleado fue un Mettler-Toledo DSC 822e. Las muestras se sometieron a rampas de temperatura de 25 a 120 °C con una pendiente de 0.6°C/min., bajo una atmósfera de nitrógeno. La temperatura de desnaturalización se determinó aplicando el software incorporado en el equipo. Las disoluciones empleadas fueron del 12% p/v de las proteínas nativas y conjugadas<sup>68</sup>.

### **3.7.5 IMC: microcalorimetría isoterma.**

Este ensayo fue empleado para medir la variación de energía libre del sistema que se producía durante la conjugación de las proteínas. La hemoglobina fue escogida como modelo debido a su alto grado de pureza y como azúcar dextrano de 10 kDa. Para

el análisis fueron empleadas mezclas de hemoglobina liofilizada y del azúcar en una proporción 1:3 p/p. El equipo utilizado fue un CSC Mettler-Toledo modelo 4400. La temperatura del ensayo se fijó en 60 °C. Los pesos exactos de cada muestra fueron determinados y posteriormente relacionados con la variación de energía interna del sistema.

#### **3.7.6 Medida de las propiedades antioxidantes.**

Para determinar las propiedades antioxidantes de los péptidos se realizaron medidas de la capacidad reductora, captura del radical hidroxilo y capacidad quelante los de iones de hierro bivalentes.

##### 3.7.6.1 Poder reductor

El poder reductor fue determinado siguiendo el método de Yen and Chen<sup>134</sup> con ligeras modificaciones, realizadas para tratar con disoluciones coloreadas como las de la hemoglobina. Los péptidos obtenidos fueron disueltos a diferentes concentraciones en un tampón fosfato (0.2 M y pH=6.6), a estas disoluciones se les agregó 2.5 mL de ferrocianida potásica al 1% p/v. La mezcla fue incubada durante 20 minutos a 50 °C en un baño de agua termostatizado. Al finalizar se le agregaron 2.5 mL de ácido tricloroacético al 10% p/v, para precipitar los péptidos y enfriar la muestra. El paso siguiente fue una centrifugación durante 10 minutos a 5000 g (Kubota 6700). Del sobrenadante obtenido se recuperaron 2.5 mL que se mezclaban con 500 µL de cloruro férrico. Por último, se tomaban medidas de la absorbancia a 700 nm (Thermo Scientific, Helios  $\gamma$  UV-Visible) a diferentes intervalos de tiempo. Un incremento de la



absorbancia con respecto al blanco era indicativo de la existencia de poder reductor en la muestra.

#### 3.7.6.2 Capacidad de captura del radical hidroxilo

Este método fue desarrollado por Wang et al.<sup>126</sup>. En un volumen total de 4.5 mL se incubaban durante 30 minutos a 37°C los siguientes compuestos en la concentración indicada entre paréntesis: EDTA-Fe<sup>2+</sup> (0.22 mM), safranina O (0.23 μM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (60 μM), en un tampón de fosfato potásico (pH 7.4, 0.15 M), dónde hay una concentración de proteína que oscila desde 0.62 a 65 μg/mL. Después de la incubación la absorbancia de la muestra era medida a 520 nm (Thermo Scientific, Helios γ UV-Visible). El radical hidroxilo decolora la safranina, por lo que a mayor capacidad de la proteína de capturarlo, menor disminución de absorbancia era observado. El grado de captura del radical viene dado por la siguiente expresión:

$$\% \text{ del efecto de captura} = \left[ \frac{A_1 - A_B}{A_C - A_B} \right] \times 100 \quad (3.4)$$

Siendo A<sub>B</sub> el blanco sin proteína, A<sub>C</sub> la absorbancia del control, sin añadir agua oxigenada y A<sub>1</sub> la absorbancia de las muestras de proteína

#### 3.7.6.3 Poder quelante del ion ferroso

La habilidad quelante de los péptidos fue determinada con el método publicado por Dinis<sup>37</sup>. 5 mL de diferentes concentraciones de péptidos fueron mezclados con 100 μl de una disolución 2 mM de FeCl<sub>2</sub> y con 200 μl de una disolución 5 mM de

Ferrozine® (ácido 3-(2-Piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfónico monosódico). La mezcla era incubada durante 10 minutos a temperatura ambiente y pasado este tiempo la absorbancia era medida a 562 nm (Thermo Scientific, Helios γ UV-Visible). El complejo Fe<sup>2+</sup>/Ferrozine posee una gran absorbancia a esta longitud de onda. La capacidad quelante fue determinada del siguiente modo:

$$\% \text{ capacidad quelante} = \left[ \frac{(A_0 - A_1)}{A_1} \right] \times 100 \quad (3.5)$$

En dónde A<sub>0</sub> corresponde a la medida del blanco (sin péptidos) y A<sub>1</sub> a la medida de la muestra con los péptidos.

### 3.7.7 Análisis de los productos de la hidrólisis

En trabajos previos, realizados con hidrolizados, se observó que siempre aparecían dos fracciones diferenciadas en las muestras obtenidas durante y al final de cada experimento. Dentro de estas dos fracciones, una sólida y otra líquida, se encontraban a su vez diferentes componentes en cada una de ellas. En el siguiente esquema se señalan las diferentes muestras analizadas:

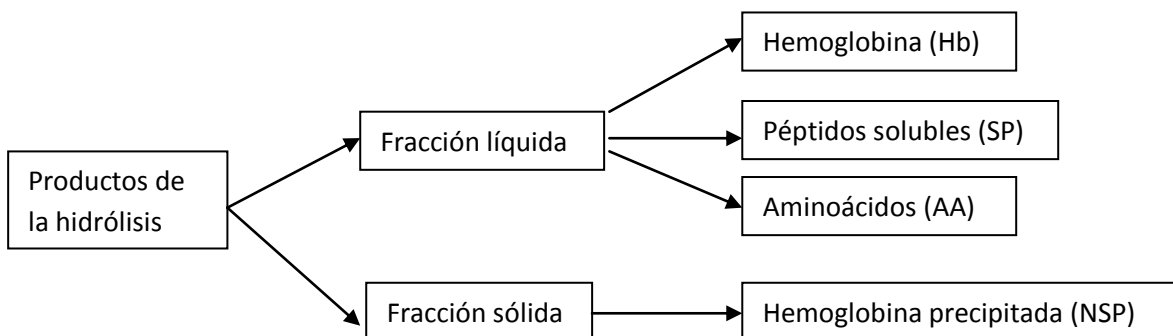


Figura 11. Fracciones encontradas en el medio después de la hidrólisis química y física.

Ambas fases eran fácilmente separadas por centrifugación. Por tanto cada una de estas fracciones requiere un método de análisis diferente.

#### 3.7.7.1 Análisis cuantitativo de aminoácidos

Se utilizó el método de Rosen<sup>100</sup> el cual está basado en el desarrollo de un compuesto coloreado al reaccionar la ninhidrina con aminoácidos libres presentes en la muestra. A 0.5 mL de muestra se le añadieron 0.25 mL de tampón acetato a pH=5.1 y 0.25 mL de una disolución al 3% p/v de ninhidrina en etanol absoluto. Durante la preparación del ensayo los tubos estaban introducidos en hielo, para evitar que la reacción, dependiente de la temperatura, comenzara. Una vez mezclados los tres componentes, los tubos de ensayo eran cerrados herméticamente e introducidos en agua hirviendo durante 15 minutos. A continuación eran enfriados de nuevo sumergiéndolos en hielo. Cuando ya habían enfriado se agregaba a cada tubo 2.5 mL de una disolución al 50% (v/v) de 2-isopropanon/agua, la cual interrumpía por completo la reacción y desarrollaba más aun el color azulado resultante. Un patrón con L-lisina era preparado en un rango de 0.4-0.04  $\mu\text{M}$  para realizar la curva de calibrado. Por último, el color resultante era medido en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Helios  $\gamma$  UV-Visible) a 570 nm de longitud de onda.

#### 3.7.7.2 Análisis de productos no solubles

Alícuotas de la muestra de un volumen conocido fueron colocadas en tubos previamente secados a 60 °C y pesados. Dicho volumen fue centrifugado durante 10 minutos a 5000 g; el sobrenadante era desechado y el precipitado guardado. Éste estaba compuesto por sales precipitadas y por proteína no soluble. Para eliminar las sales

presentes, y por tanto evitar que interfieran en la medida real de la fracción no soluble, eran realizados 3 lavados con agua destilada, cada uno de ellos seguido por una centrifugación (10 minutos a 10.000 g). Así, se eliminaban los restos de sal. Finalmente los pellets son secados durante 24 horas en una estufa a 60°C, el peso final del pellet era determinado (Cobos precision), y por consiguiente la concentración de los péptidos no solubles presentes en la muestra.

#### 3.7.7.3 Análisis de productos solubles

Para analizar el tamaño final de los péptidos obtenidos, así como su concentración se recurrió a la cromatografía de exclusión de tamaño (SEC). El equipo empleado fue una FPLC (siglas en inglés de *fast protein liquid chromatography*) (Farmacia AKTA), formado por los módulos UPC-900 y P-920 . El equipo constaba de una lámpara de mercurio que emite luz a 280 nm y posteriormente era recogida por un detector. Esta longitud de onda es a la cual los aminoácidos aromáticos producen un máximo de absorbancia.

Fue instalada una columna Superdex 75 10/300 en el equipo, fue elegida para los hidrolizados químicos porque su rango óptimo de separación se sitúa entre 3.000 y 70.000 Da; el cual es muy apropiado ya que la hemoglobina tiene un tamaño de 65.000 daltons. Para los hidrolizados físicos, de menor tamaño, fue empleada una columna Superdex Peptide 10/300 GL, cuyo rango óptimo de separación es de 100 a 7000 Da. El tampón de elución escogido estaba compuesto por agua destilada y Trizma pH=7.6, 50 mM; el flujo de trabajo fue fijado en 1 mL/min. Las muestras y los tampones fueron filtrados por un filtro de 0.45 micras, para evitar ensuciar la columna.

La columna fue calibrada tanto para determinar el tamaño de las proteínas como para la concentración de las mismas. Las proteínas utilizadas como patrones de tamaño fueron: azul dextrano (2.000.000 Da), BSA (65.000 Da), anhidrasa carbónica (29.000 Da), citocromo C (12.400 Da) y aprotinina (6.600 Da), siendo  $R^2=0,989$ . Como patrón de concentración se uso hemoglobina en un rango comprendido entre 0 y 40 mg/mL, calculándose posteriormente el área de los picos obtenidos ( $R^2=0,993$ ).

En el caso particular de los hidrolizados obtenidos en el reactor se tuvo que realizar un calibrado para cada uno de ellos, debido a que presentaban diferente coeficiente de extinción molar a 280 nm, cosa que no ocurría con los obtenidos por hidrólisis química, que era igual al de la hemoglobina nativa. Para ello se liofilizaron péptidos procedentes de cada condición experimental, y se realizaron patrones de concentración comprendidos entre 2 y 40 mg/mL. La equivalencia entre el área del pico obtenido y cada tipo de muestra se refleja en la Tabla 11.

*Tabla 11. Absorbancia según la concentración y el tipo de muestra.*

<b>Tipo de muestra</b>	<b>ppm/mUA</b>
Hemoglobina	1.68
Péptidos con oxígeno	4.82
Péptidos con nitrógeno	13.84

Los cromatogramas así obtenidos fueron tratados con el programa informático Unicorn 5.1 de Pharmacia, AKTA. Utilizando el patrón de tamaño realizado, se dividieron los cromatogramas en áreas, las cuales estaban comprendidas entre los volúmenes de elución correspondientes a tamaños moleculares prefijados. Ver figura 12.

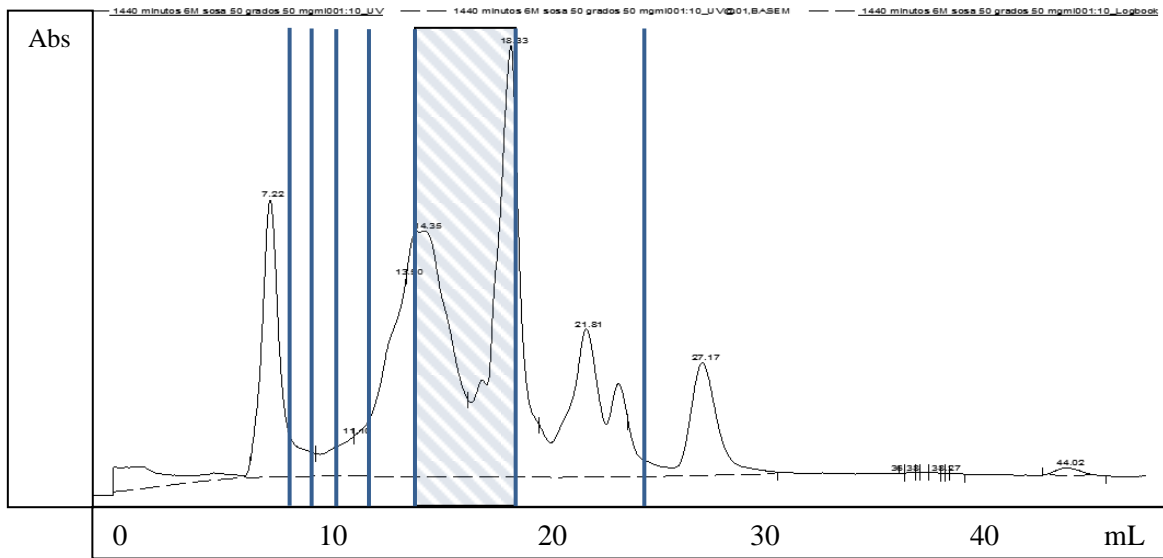


Figura 12. Cromatograma de los péptidos solubles obtenidos por hidrólisis química. Las líneas azules representan los tiempos de elución correspondientes, de izquierda a derecha, a 60, 50, 40, 30, 20, 10 y 6 kDa.

Con lo cual podemos establecer que:

$W_i = \text{area comprendida entre dos marcas} / \text{área total}$

$A_i = \text{tamaño medio molecular de cada área.}$

$$W_m = \sum W_i a_i,$$

Siendo  $W_m$  el tamaño medio de los péptidos obtenido en cada caso. De este modo se podía monitorizar cómo evolucionaba el tamaño de los péptidos y se comprobaba que cantidad de hemoglobina permanecía en estado nativo.

Si se coge como ejemplo la zona con trama de la Figura 12, se observa que está comprendida entre los volúmenes de elución correspondientes entre 10 y 20 kDa, por lo que asignamos un tamaño medio de 15 kDa a los péptidos de zona del cromatograma. Si

el tamaño es multiplicado por el área detectada en esa zona y luego dividido por el área total se puede saber qué proporción de péptidos de este tamaño hay con respecto al total.

#### 3.7.7.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La fracción no soluble que era obtenida tras la hidrólisis química fue analizada por este método para poder compararlo con los péptidos que permanecían en estado soluble. Las fracciones NSP y SP fueron resuspendidas en una disolución de ácido trifluoroacético (ATF) al 1% v/v, con una concentración final de proteína de 500 ppm, para finalmente ser filtradas con un filtro de PVDF de 0.45 micras de tamaño de poro. La cantidad inyectada fue de 20  $\mu$ l.

El equipo de HPLC empleado fue un cromatógrafo Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, USA) equipado con una bomba doble, muestreador automático y un detector de fotodiodo. El equipo era controlado por el programa informático *Agilent ChemStations for LC Systems*. Como medio cromatográfico se empleó una columna analítica de fase reversa (Zorbax 300 SB-C18, Agilent Technologies) en cuyo interior había una matriz de sílica-gel (5  $\mu$ m, 300Å, 150mm×4.6mm). El análisis se realizó a 40°C y a un flujo de 1 mL/min.

Los tampones empleados para realizar las rampas de elución fueron los siguientes: (A) 0.1% v/v de ácido trifluoroacético en agua ultrapura y (B) 0.1% v/v de ácido trifluoroacético en acetonitrilo. Después de equilibrar la columna con un 98% de tampón A, se realizó un gradiente constante durante 60 minutos hasta alcanzar una concentración del 98% del tampón B. La detección se realizó a una longitud de onda de 214 nm, a la cual los enlaces peptídicos presentan un máximo de absorbancia.

#### 3.7.7.5 Cuantificación de compuestos amoniacaes

Las muestras de agua obtenidas del borboteador durante la hidrólisis fueron almacenadas en tubos de vidrio hasta su análisis. El método de Nessler fue empleado para realizar estas mediciones.

Se construyó una recta de calibrado empleando cloruro amónico en el rango de 1-14 ppm. Las muestras obtenidas del borboteador fueron diluidas con agua destilada hasta que se encontraban dentro del rango del método de Nessler. A 10 mL de estas diluciones se les agregaba un mililitro del reactivo de Nessler, se agitaba y se dejaba que desarrollara el color durante 10 minutos a temperatura ambiente. Un blanco en el que solo había agua destilada y reactivo de Nessler fue empleado para obtener la línea base en el espectrofotómetro. A continuación la absorbancia fue medida (Thermo Scientific, Helios  $\gamma$  UV-Visible ) a 410 nm.





## *4.- Resultados y Discusión*



#### 4.1 PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS SANGUINEAS NATIVAS

La sangre de porcino procedente del matadero de Junquera-Bobes (Asturias) fue recogida directamente del cuello del animal, en un recipiente esterilizado en cuyo interior se encontraba un anticoagulante en la proporción adecuada, en este caso se empleó citrato sódico, a una concentración del 2 % p/v. con respecto al volumen final de la sangre recolectada.

A continuación la sangre era refrigerada y centrifugada. En este paso la sangre se separó en sus dos fracciones: plasma y células rojas. El plasma refrigerado fue filtrado para eliminar la grasa presente en la sangre y posteriormente se fraccionó empleando etanol, tal como es descrito por Moure<sup>83</sup>. Este fraccionamiento daba origen a cuatro fracciones de composición muy diferente: FI formada por fibrinógeno, FII por  $\beta$  y  $\gamma$ -globulinas mayoritariamente, FIII compuesta por  $\alpha$ -globulinas de manera principal y FIV dónde la presencia mayoritaria es la de la albúmina sérica. El precipitado obtenido en cada una de las fases del fraccionamiento es resuspendido en un volumen igual al de plasma original y su contenido en sólidos y proteína analizado. El resultado de dicho análisis se muestra en la Tabla 12.

*Tabla 12. Contenido en sólidos totales y en proteína de las fracciones plasmáticas.*

	<b>Plasma</b>	<b>FI</b>	<b>FII</b>	<b>FIII</b>	<b>FIV</b>
<b>Proteína (%)</b>	7,35	0,18	2,8	1,6	2,6
<b>Sólidos (%)</b>	8	0,20	3,1	1,8	2,7

De los datos mostrados en la Tabla 12 se puede observar que la pureza de proteínas en cada una de las fracciones es de al menos un 95%. Estas fracciones pueden ser posteriormente liofilizadas para obtener un material de fácil conservación y manipulación.

Por su parte, la hemoglobina puede ser también liofilizada una vez ha sido extraída de los glóbulos rojos y separada de las membranas, tal y como se describe en el capítulo 3 de este trabajo. El líofilo obtenido presenta una pureza superior al 95%, como ocurría con las membranas plasmáticas. Esta hemoglobina posteriormente puede ser procesada para obtener globina soluble y globina decolorada insoluble.

Una vez obtenidas las diferentes fracciones sanguíneas se realizaron los estudios pertinentes para evaluar sus propiedades funcionales. Con los resultados de dicho estudio obtenidos se analizaron las diferentes aplicaciones que se pueden dar a cada una de las proteínas dentro de la industria alimentaria.

#### **4.1.1 Solubilidad**

El primer trabajo realizado fue la determinación de la solubilidad. Esta propiedad es de las más importantes, ya que en uno u otro grado el resto de propiedades funcionales dependen directamente de ella. Las proteínas objeto de estudio de la sangre de porcino han sido: albumina, globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), fibrinógeno y el plasma sin fraccionar, así como la hemoglobina y la globina (coloreada y decolorada) de la fracción celular. Los datos obtenidos son la media de los resultados de experimentos realizados por triplicado. Debido a que el pH es uno de los factores ambientales que más influye en

la solubilidad de las proteínas, el estudio se realizó en un rango de valores de pH que oscila entre valores de 3 y 8.

Como se puede observar en la Figura 13, todos los resultados obtenidos para la solubilidad de las proteínas plasmáticas siempre se encuentran en valores superiores al 50%, exceptuando al fibrinógeno. El fibrinógeno posee una solubilidad muy baja, con valores inferiores al 20% en todo el rango de pH. Este resultado es debido a la estructura fibrilar de la proteína, la cual la hace más insoluble.

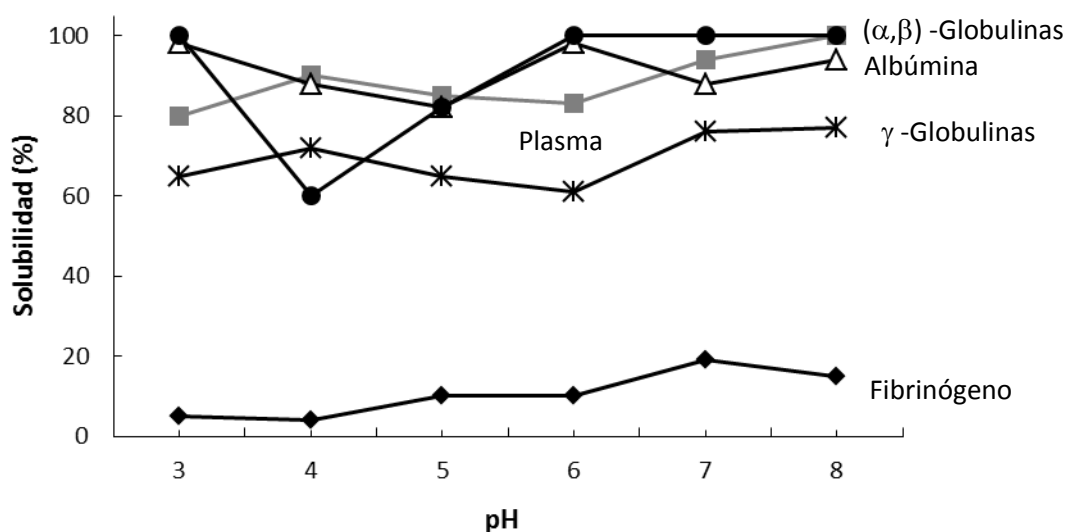


Figura 13. Efecto del pH en la solubilidad de las proteínas del plasma (Fibrinógeno, Albúmina porcina, (α,β)-Globulinas y γ-Globulinas) y en el plasma sin fraccionar.

La albúmina porcina tiene una solubilidad cercana al 80%, dentro del rango de pH ensayados, con un valor mínimo en el rango de pH de 4 a 6. Estos valores relativamente bajos de la albúmina porcina en pH próximos a 6 puede ser debida a la polimerización que ésta sufre en medios ácidos, hecho que provoca su precipitación. Para las globulinas, el mínimo de solubilidad corresponde al punto isoeléctrico. A este pH, las moléculas de las proteínas presentan una mínima interacción con el solvente y

sus cargas netas se hacen lo suficientemente débiles para que las cadenas polipeptídicas se aproximen, las cuales precipitan juntas y por tanto resulta en una disminución de la solubilidad.

Las globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), presentan una alta solubilidad, con valores por encima del 60% en todo el rango de pH ensayados. Existen pequeñas variaciones en la solubilidad con los diferentes pH, pero no son significativos, lo que indica que estas proteínas pueden ser aplicadas como aditivos alimentarios en productos con un rango de pH bastante amplio.

La solubilidad del plasma varía desde un 80% a pH=3 hasta el 100% de solubilidad a pH=8. Estos resultados son similares a los presentados por la albúmina purificada (la cual es la proteína mayoritaria en el plasma) y por tanto explicaría el comportamiento de la solubilidad del plasma.

Por su parte, la solubilidad de la hemoglobina extraída de las células sanguíneas puede ser observada en la Figura 14. El rango de valores medidos oscila entre un 75% y un 95% de solubilidad. En cuanto a la globina (tanto en su forma coloreada como decolorada), presenta los valores de solubilidad más bajos de todas las proteínas que se han ensayado (con la excepción del fibrinógeno) debido, en gran parte, al tratamiento más agresivo al que se ven sometidas estas proteínas durante el proceso de extracción. La globina decolorada con peróxido de hidrógeno es la que presenta los valores más bajos de solubilidad, siendo tan solo del 15% a pH=7. Esto demuestra que los tratamientos empleados para su aislamiento y purificación (tales como precipitación, extracción, centrifugación, etc.) son muy agresivos, provocando un elevado grado de desnaturalización en las proteínas, lo que afecta negativamente a su solubilidad.

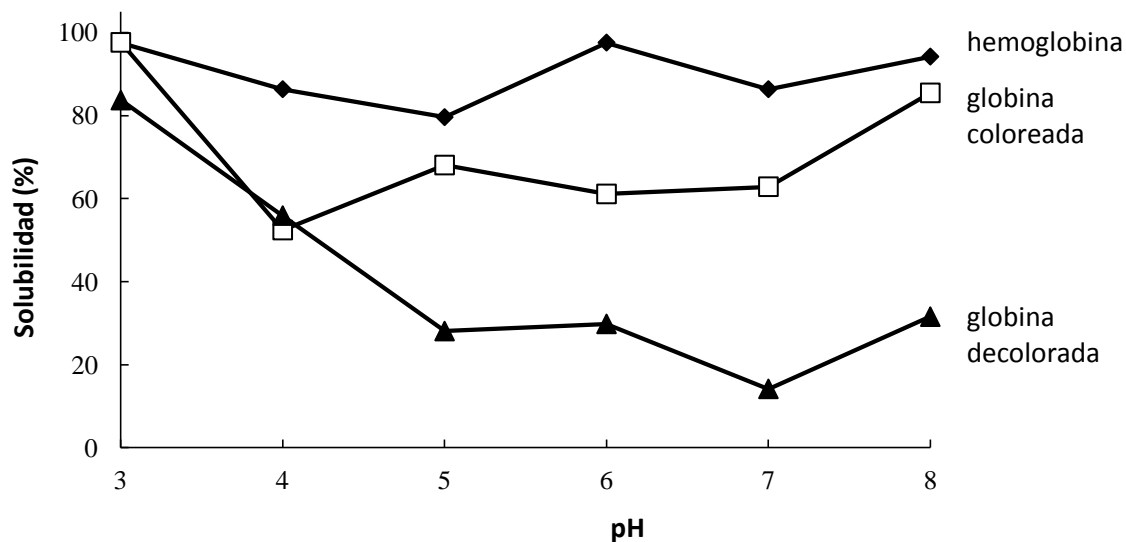


Figura 14. Efecto del pH del medio en la solubilidad de proteínas celulares. Hemoglobina, globina coloreada y globina decolorada.

#### 4.1.2 Capacidad de emulsificación

La capacidad emulsionante fue determinada siguiendo el protocolo desarrollado por Inklar<sup>60</sup>, detallado en la metodología. Las siguientes Figuras 15 y 16 muestran la capacidad de emulsificación de las proteínas plasmáticas y celulares de la sangre porcina. Debido a que la concentración de la proteína como agente emulsionante es un factor determinante, la capacidad de emulsificación se determinó a diferentes concentraciones de proteína.

En lo referente a las proteínas plasmáticas, se puede observar en la Figura 15 que los valores de emulsificación de la albumina porcina son muy bajos, entre el 25-30%, con apenas diferencias entre las diferentes concentraciones ensayadas. La baja capacidad de emulsificación de la albumina puede ser debida a su estructura globular, la



cual impide que los grupos hidrofóbicos interaccionen con los lípidos, ya que de manera predominante se sitúan hacia el interior de la proteína.

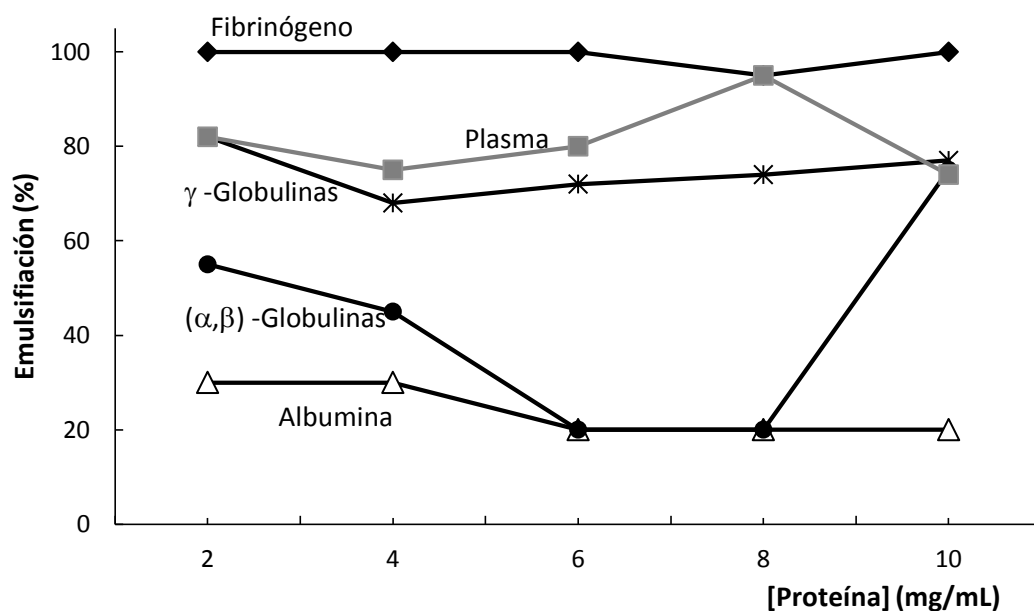


Figura 15. Capacidad de emulsificación de proteínas del plasma. Fibrinógeno, albúmina porcina,  $\gamma$ -Globulinas,  $(\alpha, \beta)$  Globulinas, y plasma completo.

Por su parte, las  $\gamma$ -globulinas, poseen un rango de emulsificación que oscila entre 70 y 85%, esta alta capacidad emulsionante puede ser debida a su estructura tridimensional. Las cadenas polipeptídicas rompen sus puentes di-sulfuro, las zonas hidrofílicas se separan de las zonas hidrofóbicas y estas últimas interaccionan con las grasas, acentuando su carácter anfótero. Las  $\alpha$  y  $\beta$ -globulinas presentan unas buenas propiedades emulsionantes, en este caso las interacciones de las cadenas peptídicas con los lípidos también aumenta con el aumento de la concentración. Cabe destacar que la capacidad del fibrinógeno para emulsionar grasas es la más alta de entre todas las

proteínas plasmáticas, alcanzando prácticamente el 100% de grasa emulsionada para todas las concentraciones ensayadas.

La capacidad del plasma completo de emulsionar aceites es cercana al 80%, debido a la mayor influencia del fibrinógeno y de las globulinas contenidas en el plasma; lo cual confiere al plasma unos valores elevados de emulsificación. Por otro lado, es importante destacar que la albumina, a pesar de ser la proteína mayoritaria (ha de recordarse que la albumina supone aproximadamente el 45% de las proteínas contenidas en el plasma, y su contribución es muy importante para el comportamiento del plasma) no ejerce una gran influencia en la capacidad emulsionante del plasma. De acuerdo con estos resultados, el plasma parece ser un buen agente emulsionante y podría competir con la proteína de soja, por ejemplo, como aditivo alimentario para mejorar las propiedades funcionales de algún producto alimentario. Además, a pesar de que el fibrinógeno presenta la menor solubilidad de todas las proteínas, es la que mayor capacidad emulsionante presenta y podría ser agregada como un aditivo para productos alimentarios con alto contenido en grasas como bizcochos, productos cárnicos o repostería.

Por su lado la hemoglobina, incrementa su capacidad emulsionante a la vez que se aumenta la concentración de la misma, tal como puede observarse en la Figura 16, especialmente a partir de concentraciones de 6 g/L. La globina decolorada presenta valores de emulsificación de entre el 10-15%, esto se debe a la desnaturalización que sufre a causa del tratamiento de decoloración que origina una baja solubilidad y propicia la formación de agregados. Todos estos factores en conjunto hacen que su capacidad emulsionante sea muy baja. Para obtener los mejores resultados como emulsionante, la

globina debe ser llevada a un pH de 4-5<sup>14</sup> y el ensayo de la emulsificación se hizo a un pH más cercano a la neutralidad, fuera de su valor óptimo como agente emulsionante.

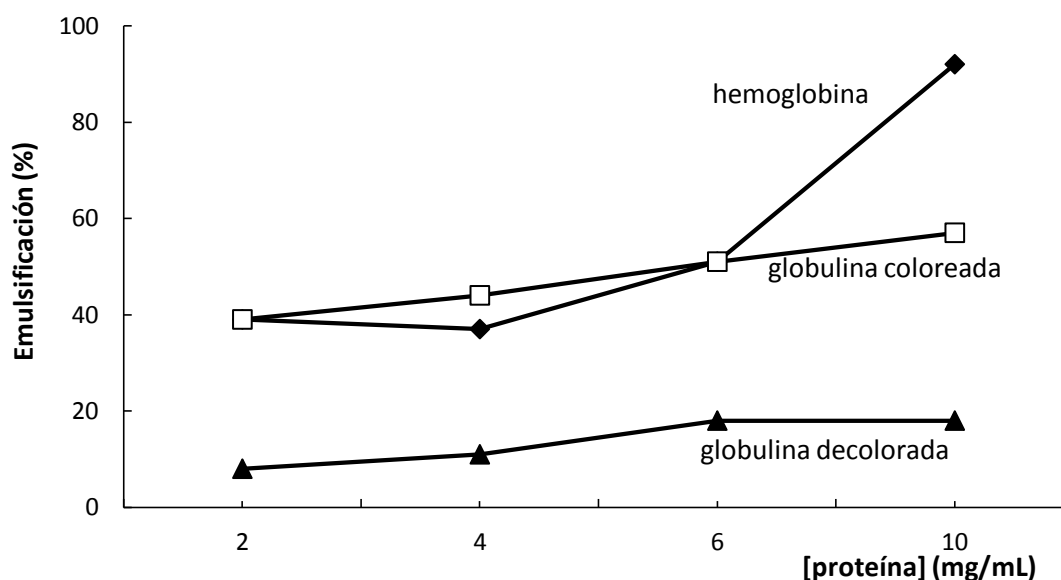


Figura 16. Capacidad de emulsificación de las proteínas celulares. Hemoglobina, globulina coloreada y globulina decolorada.

Comparando las propiedades emulsificantes de las proteínas sanguíneas como el fibrinógeno o el plasma completo, con otras proteínas reconocidas por su excelente papel como emulsionador (como caseína o proteínas de soja), se puede ver que las proteínas aquí ensayadas podrían ser usadas como aditivos para productos cárnicos o de panadería.

#### 4.1.3 Capacidad espumante

El volumen de la espuma formada por el plasma, las proteínas plasmáticas y la fracción celular en función del pH del medio se muestra en las Figuras 17 y 18 respectivamente. A partir de la Figura 17 se puede observar que el plasma produce los

valores de espuma más altos a pH=4. Estos resultados son similares a los encontrados para la albúmina porcina, lo que puede ser debido a que la estructura de esta proteína es más compacta a valores de pH cercanos a su punto isoeléctrico (pI=4.7). A este valor de pH las atracciones electrostáticas intermoleculares son importantes, con lo que se produce una agregación de las proteínas. Este estado de agregación disminuye cuando el pH se aleja del pI. Por el contrario, para las globulinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), el volumen de la espuma formada aumenta cuando el pH se aleja del pI. Esto se debe a que estas proteínas fibrosas forman agregados que impiden la formación de espumas a un pH próximo a su pI. Por otro lado, el fibrinógeno no forma espuma a valores de pH ácidos (menores de 4). Así, el mayor volumen de espuma detectado para el fibrinógeno fue a pH=8, lo cual puede ser debido también a su estructura miofibrilar, que provoca que las moléculas de agua sean retenidas por la proteína adsorbida en la interfase agua/airea. A la vista de estos resultados podemos afirmar que las proteínas fibrosas como las globulinas y el fibrinógeno forman los mayores volúmenes de espumas a pH diferentes a su pI.

En la Figura 18, está reflejado que el volumen de espuma formado por la globina es mayor cuando el pH=4, disminuyendo considerablemente cuando nos alejamos de este valor. Por el contrario, la capacidad espumante de la hemoglobina es mayor a pH=8. De nuevo, tal y como se había indicado anteriormente, se ha constatado que las proteínas globulares como la hemoglobina, globina y albumina porcina forman los mayores volúmenes de espuma a un pH similar al de su pI.

Finalmente, cabe indicar que en todos los ensayos llevados a cabo, la espuma mantuvo su volumen constante durante los primeros quince minutos. Esto se traduce en

una buena estabilidad en productos que requieran la presencia de compuestos espumantes.

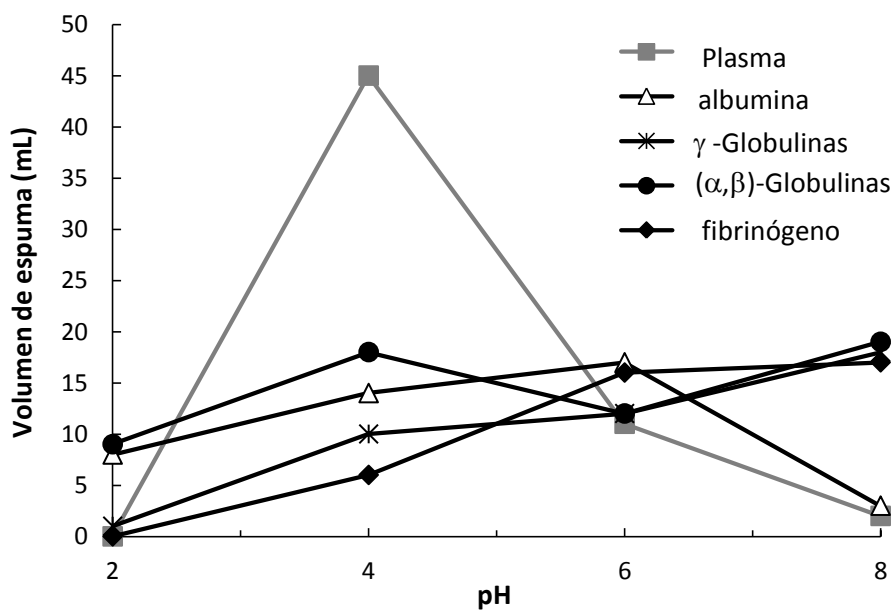


Figura 17. Efecto del pH en la capacidad espumante de las proteínas del plasma (albúmina porcina,  $\gamma$ -Globulinas, ( $\alpha,\beta$ )-Globulinas, y fibrinógeno) y en el plasma completo.

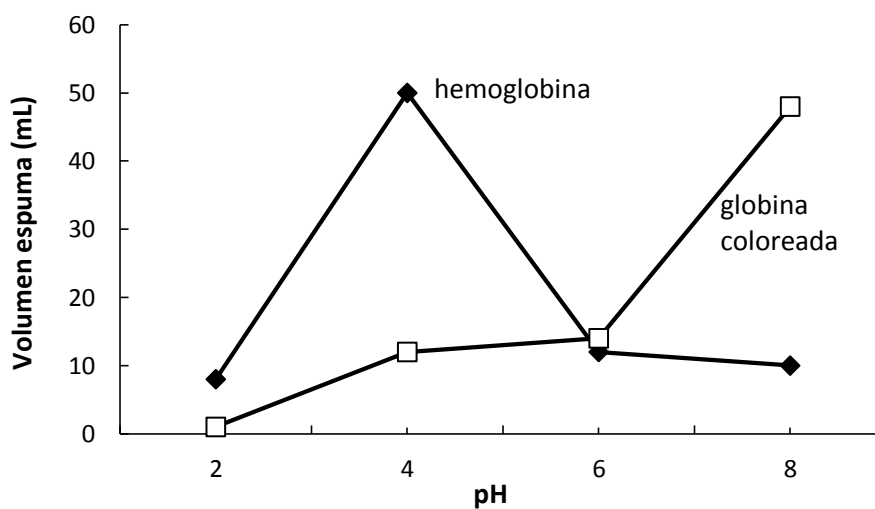


Figura 18. Efecto del pH en la capacidad espumante de proteínas celulares. Globina coloreada y hemoglobina.

#### 4.1.4 Propiedades gelificantes

A la hora de evaluar esta propiedad funcional hay que estudiar dos parámetros diferentes, por un lado la temperatura a la que se forma el gel ( $T_{gel}$ ) y, por otro, la concentración mínima necesaria para que se forme un gel consistente, lo que se denomina LGC (siglas en inglés de *lowest gel concentration*).

En la Tabla 13 se muestran las temperaturas de gelificación ( $T_{gel}$ ) obtenidas para las diferentes proteínas ensayadas. En el caso de la hemoglobina no fue posible obtener un valor determinante de  $T_{gel}$ , ya que cuando la disolución de hemoglobina se calentaba se formaban precipitados debido al efecto de la temperatura sobre su solubilidad. Estos precipitados, en forma de partículas sólidas, se colocaban entre los platos del reómetro, interfiriendo en la toma de medidas, que no resultaban reproducibles ni exactas.

Tabla 13.  $T_{gel}$  en disoluciones de proteínas al 10% (p/v) a pH 6 y concentración mínima de gelificación (LGC) para dichas proteínas.

Proteína	$T_{gel}$ (°C)	LGC (%p/v)
Fibrinógeno (FI)	56.8	4
$\gamma$ -globulinas (FII)	56.9	2
$\alpha$ y $\beta$ -globulinas (FIII)	44.8	2
Albúmina (FIV)	67.7	4
Plasma completo	71.4	6

Los diferentes valores obtenidos en la temperatura de gelificación se deben a las diferencias estructurales que las proteínas presentan entre sí. El rango de  $T_{gel}$  observado se sitúa entre los 45 y los 70°C, lo cual es de gran utilidad para diferentes aplicaciones tecnológicas. Concretamente, la fracción que contiene las globulinas  $\alpha$  y  $\beta$  es la que presenta la temperatura más baja de gelificación, seguida por el fibrinógeno y las  $\gamma$ -globulinas que poseen un valor de  $T_{gel}$  intermedio. Finalmente, la temperatura más alta de gelificación se observaron para la albumina de cerdo (67.7°C) y para el plasma sin fraccionar (71.4°C), valores similares a otros encontrados en la bibliografía para el plasma completo<sup>30</sup>.

Adicionalmente, se obtuvieron los valores del módulo elástico  $G'$ . Este parámetro arroja información acerca de la resistencia que un determinado material o compuesto ofrece a la deformación, y que cantidad de esfuerzo (medido en Pa) es necesario aplicar para que se deforme, en este caso en un 1%. Una vez que las muestras alcanzaban los 90°C los datos de  $G'$  eran tomados. Los resultados obtenidos fueron de 40.000, 47.000 y 4.200 Pa para las fracciones FII, FIII y FIV respectivamente, es decir, a las fracciones FII y FIII se les debe aplicar diez veces más energía para obtener el mismo grado de deformación. Estos valores del módulo elástico se sitúan en el mismo rango que los de geles formados por proteína de yema de huevo<sup>25</sup> o de vísceras de animales<sup>103</sup>.

Por otro lado, la concentración de proteína mínima necesaria para formar un gel fue evaluada en un rango de concentraciones que iban desde el 1 al 8% peso/volumen. Se encontró que la albumina y el fibrinógeno eran capaces de formar geles estables a una concentración del 4% p/v, mientras que las albúminas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) formaban geles a

concentraciones de tan sólo un 2% p/v. Estos resultados son debidos a la diferente estructura de cada una de las proteínas. Por su parte, el plasma presentaba unos valores intermedios, necesitándose un 6% p/v para que los geles se formaran. Para concluir, la hemoglobina tan solo era capaz de formar un gel muy débil a una concentración del 8% p/v, sin embargo el gel formado por el método empleado en este trabajo era muy débil, no pudiendo considerarse un verdadero gel, ya que al invertir el tubo de ensayo se deslizaba a lo largo de sus paredes.

Finalmente, es interesante señalar que los resultados aquí mostrados para el LGC de las proteínas sanguíneas, son iguales o mejores que los publicados por otros autores para el plasma vacuno<sup>2</sup> o el gluten con o sin tratamiento térmico previo<sup>127</sup>, el cual se utiliza habitualmente en la industria alimentaria como agente gelificante.

#### **4.1.5 Comparación y aplicabilidad de las propiedades funcionales**

En la Tabla 14 se resumen los valores medios para las propiedades funcionales estudiadas (solubilidad, emulsificación, capacidad espumante y gelificante) en este trabajo, cuando se trabaja a valores de pH cercanos a la neutralidad (entre 5 y 7 unidades) por ser éstos los más frecuentes en la industria alimentaria. Como se observa, las proteínas analizadas en este trabajo presentan unas buenas propiedades para poder ser aplicadas en la industria de la alimentación. La globina decolorada presenta las propiedades menos interesantes, debido a los tratamientos agresivos antes mencionados que provocan su desnaturalización.

La Tabla 15 muestra la evolución de la solubilidad y de la capacidad emulsionante para cada una de las proteínas en función del pH del medio, en



comparación con los valores que se obtendrían cuando el pH del medio se corresponde con el pI de cada una de ellas. De este modo es claramente evidente la importancia del pI como factor determinante en el comportamiento de cada una de las proteínas. A partir de los resultados obtenidos para las diferentes propiedades funcionales estudiadas, puede ser inferido que las proteínas que son capaces de formar sustanciales volúmenes de espuma pueden ser usadas para reemplazar las proteínas del huevo de gallina (como la ovoalbúmina) utilizadas actualmente en productos de repostería.

*Tabla 14. Valores promedio de volumen de espuma, solubilidad, capacidad de emulsificación y LGC de proteínas sanguíneas a pH de valor intermedios. \* -N.D. (no determinado)*

Proteína	Volumen espuma		% Emulsificación	
	(N veces respecto al volumen inicial)	%Solubilidad	(10 mg/mL proteína)	LGC
Plasma	1	86	77	6%
Albúmina	2	80	23	4%
( $\alpha$ , $\beta$ )-Globulinas	1	100	77	2%
$\gamma$ -Globulinas	1	64	81	2%
Fibrinógeno	2	7	100	4%
Hemoglobina	2	80	57	n.d.*
Globina coloreada	1	65	92	n.d.
Globina decolorada	1	80	15	n.d.

#### 4.- Resultados y Discusión

##### Propiedades funcionales de las proteínas nativas

*Tabla 15. Evolución de la solubilidad y de la capacidad emulsionante de las proteínas sanguíneas con respecto a su pI.*

Proteína	pI	Solubilidad (%)			Capacidad Emulsionante (mL)		
		pH=pI	pH<pI	pH>pI	pH=pI	pH<pI	pH>pI
Plasma	-	85			25		
Albúmina	4.7	80	↑	↑	17	↓	↓
γ Globulinas	5-7	63	↑	↑	12	↓	↑
(α,β)-Globulinas	4.9-7.3	60	↑	↑	12	↑	↑
Fibrinógeno	5.5	6	↓	↑	6	↓	↑
Hemoglobina	6.8	75.6	↑	↓	16	↓	↑
Globina	4.9-7.3	52	↑	↑	13	↑	↑
Globina decolorada	4.9-7.3	30	↑	↑	-	-	-

La Tabla 16 resume algunas de las posibilidades de uso de las proteínas sanguíneas en diferentes productos alimentarios, en los cuales podrían mejorar sus propiedades organolépticas. Así por ejemplo, las proteínas con una buena solubilidad (por encima del 80%) como el plasma completo o la albúmina pueden ser usadas como aditivos para productos lácteos como las leches ácidas (yogurt), puesto que mejorarían la consistencia y la viscosidad del producto, y podría usarse como espesante.

*Tabla 16. Aplicaciones de las diferentes proteínas sanguíneas según sus propiedades funcionales.*

<b>Alimento</b>	<b>Proteína adecuada</b>	<b>Propiedad funcional</b>
Productos de pastelería	Plasma	Espumación, Emulsificación, Gelificación
Pasteles y pastas	Fibrinógeno, Plasma	Emulsificación
Galletas	Globina decolorada	Solubilidad
Productos cárnicos	Globulinas	Emulsificación, Gelificación, Espumación
Leches ácidas	Plasma, Albúmina	Solubilidad Gelificación
Derivados del huevo	Plasma	Espumación

La globina puede ser agregada a galletas para enriquecer su contenido de proteína hasta un 18%, sin la pérdida de las propiedades organolépticas de los productos así mejorados. En función de las propiedades gelificantes de las proteínas, y de la consistencia de los geles obtenidos, este tipo de proteínas podrían ser deseables en diferentes industrial alimentarias: geles con una fuerte consistencia son empleados en productos cárnicos y en salsas, mientras que yogures, sopas y comidas infantiles requieren productos poco viscosos y geles de baja consistencia, como los conseguidos con la hemoglobina.

## 4.2 CONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS CON DEXTRANO

Una vez analizadas las propiedades funcionales de las proteínas nativas se procedió modificarlas, mediante su conjugación, con la finalidad de obtener una familia de productos más amplia que permita mayores aplicaciones. Así, se conjugaron las proteínas plasmáticas contenidas en las fracciones FII, FIII, FIV y la hemoglobina nativa. La fracción FI que contiene principalmente fibrinógeno no fue tratada dado su bajo grado de solubilidad, lo cual dificulta el proceso de conjugación. Durante la conjugación, las proteínas de baja solubilidad formarán precipitados y agregados que producirán una mezcla heterogénea, con lo que se dificulta el proceso. Se ha descrito<sup>63</sup> como la conjugación requiere un paso previo dónde el dextrano y la proteína son disueltos para obtener una disolución homogénea que posteriormente será liofilizada.

### 4.2.1 Efecto de la temperatura en la conjugación

La temperatura es uno de los parámetros físicos que más afectan a las reacciones químicas y la reacción de Maillard no es una excepción. El tiempo necesario para que esta reacción se lleve a cabo depende en gran medida de la temperatura, así es posible encontrar en la bibliografía como este proceso requiere de 24 horas cuando tiene lugar a 60°C<sup>63</sup>, mientras que si se aumenta la temperatura a 80°C es posible llevarlo a cabo en tan solo 2 horas<sup>1</sup>. Teniendo esto en cuenta, se procedió a evaluar la disminución de grupos amino libres (que son los susceptibles de ser unidos al dextrano) de las proteínas lo largo del tiempo de ensayo y a diferentes temperaturas. Las temperaturas empleadas fueron las siguientes: 70, 75 y 80°C. El procedimiento consistió en extraer muestras a tiempos regulares, y analizar la concentración de grupos amino libres. De este modo era

posible monitorizar el efecto que el binomio tiempo/temperatura producía en el grado de reducción de grupos amino. Se consideró que la conjugación había llegado a su fin cuando el número de grupos amino libres permanecía constante en el tiempo. En la Figura 19 se muestra la concentración de grupos amino libre, durante la conjugación a tres temperaturas, calculada a partir de una curva de calibración de leucina.

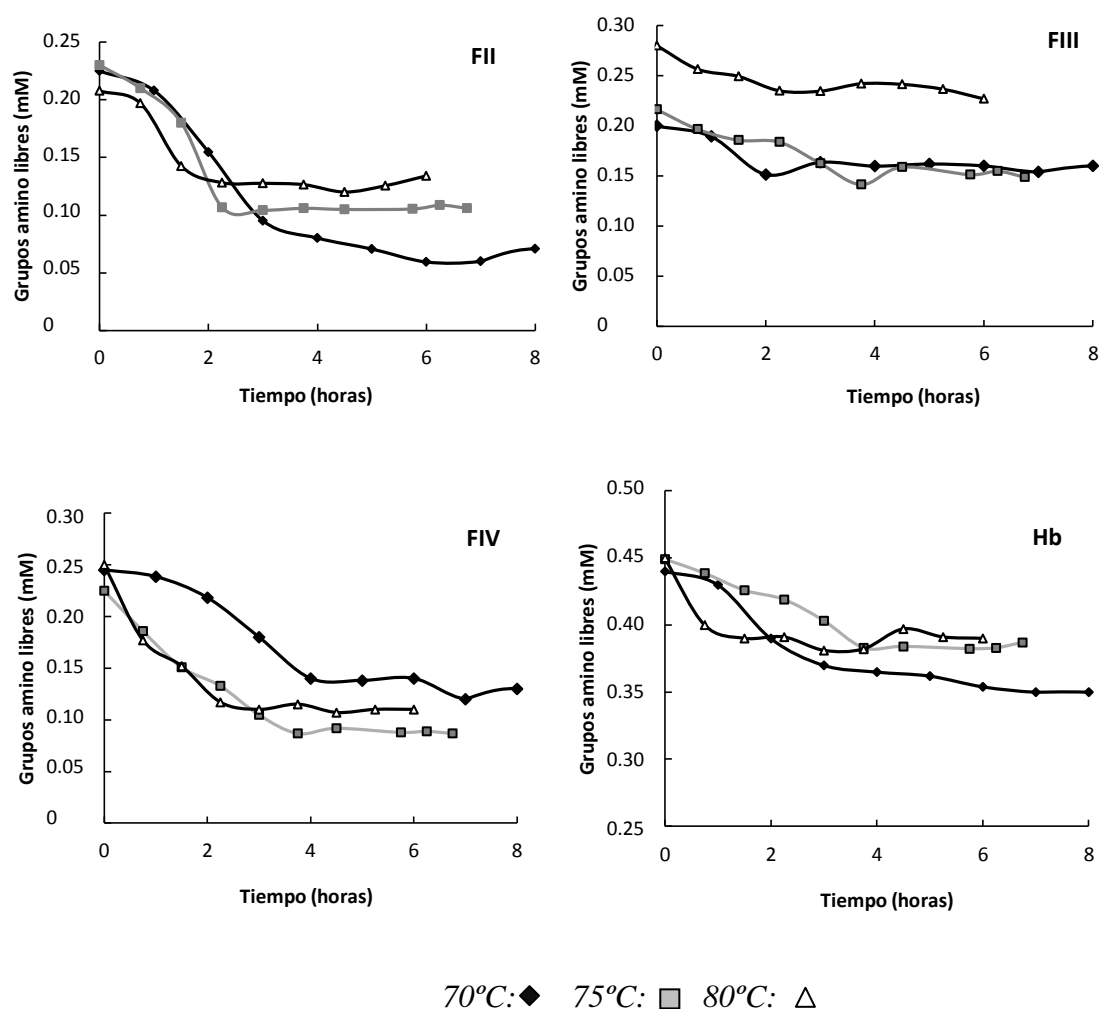


Figura 19. Evolución de la concentración de los grupos amino libres presentes en las fracciones FII, FIII, FIV y hemoglobina durante el tiempo de ensayo en función de la temperatura.

En la Figura 19 se observa como el descenso de grupos amino es mucho más marcado en las fracciones FII y FIV, para las que se produjo una reducción del 60 y el 70% respectivamente. Las proteínas de la fracción FIII presentan una reducción media

del 20 al 30% de los grupos amino y por último, la hemoglobina es la que presenta un menor grado de conjugación, con un descenso que oscila entre un 11 y un 20%. Este grado de conjugación es superior al reportado en otros trabajos en los que se empleaba plasma porcino completo<sup>12</sup>; en dónde aplicando 100°C y utilizando azúcares de bajo peso molecular se conseguía una reducción de grupos amino libre de entre el 10 y el 20%.

Por otro lado, se puede observar como la disminución de los grupos amino libres en los ensayos realizados a 70 y 75°C es mucho más pronunciada que cuando se emplean temperaturas superiores, 80°C. Este hecho fue constatado en todas las fracciones, excepto en la fracción FIV formada por albúmina, para la que los valores finales de grupos amino libre eran similares e independientes de la temperatura empleada.

Con respecto a la cinética de la reacción, ésta se ve favorecida, tal y como cabía esperar, con el efecto de la temperatura. Así, en la mayoría de las fracciones, incrementos de 5°C producen un aumento de la velocidad de conjugación, reduciendo el tiempo necesario para alcanzar un valor estable de grupos amino libre. La excepción de esta regla se observa en la fracción FIII, en la que el efecto de la temperatura parece no tener influencia en la velocidad de conjugación, consiguiéndose reducciones similares de los grupos amino en tiempos semejantes para todas las temperaturas estudiadas. En el resto de las fracciones proteicas estudiadas, cuando la conjugación se realizaba a 70°C, fueron necesarios 240 minutos para alcanzar el mínimo de grupos amino libres. La misma reacción llevada a cabo a 75°C, reduce el tiempo empleado entre 20 minutos para las fracciones FIV y HB, y 100 minutos para la fracción FII. Si la temperatura se sigue incrementando hasta 80°C, el tiempo necesario se redujo hasta 90 y 120 minutos,

dependiendo de las proteínas que se hayan estudiado. En la Tabla 17 se muestra el descenso porcentual de los grupos amino libre para cada uno de los ensayos.

*Tabla 17. Grupos amino libres (expresados mM equivalentes de leucina) detectados en proteínas nativas (inicial) y conjugadas (final). Entre paréntesis se indica el tiempo, en minutos, al que el máximo número de grupos amino son bloqueados. La columna b de la hemoglobina indica el número de grupos amino libres por molécula de proteína.*

	T (°C)	FII	FIII	FIV	Hb	
					a	b
<b>Inicial</b>	70	0.22	0.21	0.25	0.44	112
	75	0.23	0.21	0.24	0.45	115
	80	0.21	0.28	0.24	0.44	112
<b>Final</b>	70	0.08 (240)	0.15 (180)	0.11 (240)	0.35 (240)	89
	75	0.10 (135)	0.15 (180)	0.09 (225)	0.36 (225)	92
	80	0.10 (90)	0.22 (145)	0.08 (120)	0.39 (90)	102
<b>% Reducción</b>	70	63.64	28.57	66.00	19.23	
	75	56.52	28.57	70.00	20.00	
	80	51.88	21.43	68.00	11.32	

El diferente grado de reducción observado en cada fracción es debido a la diferente composición de amino ácidos de cada una de ellas. La conjugación ocurre preferencialmente entre los restos de las lisinas y el carbohidrato empleado y, de manera secundaria con la histidina, triptófano y arginina<sup>6</sup>. Si el aminoácido tiene su resto amino orientado hacia el interior de la proteína existen impedimentos estéricos que imposibilitan la formación del enlace glucosídico, por tanto es muy improbable que se consiga una reducción del 100% de los grupos amino libres.

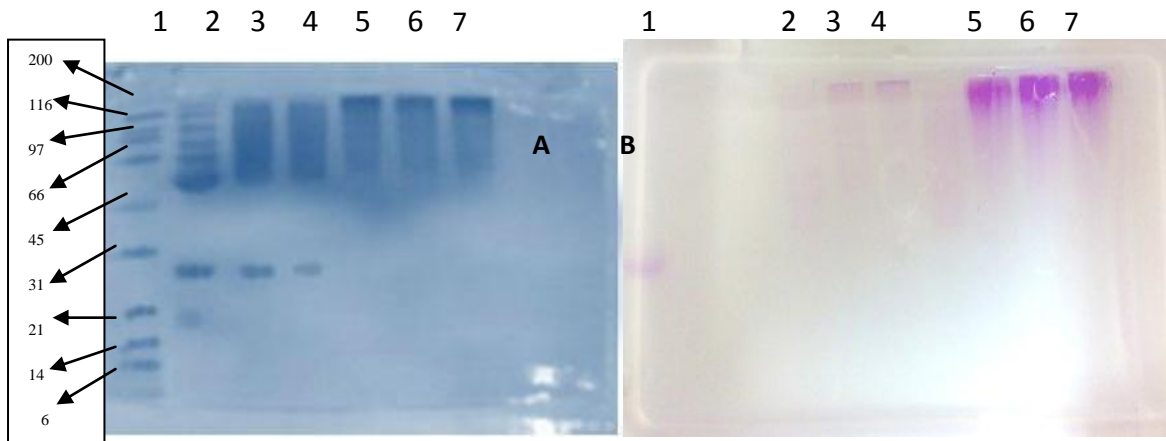
Si se analiza la secuencia de la hemoglobina veremos que contiene 44 residuos de lisina y un total de 110 grupos amino que son susceptibles de ser unidos al dextrano. Los datos mostrados en la tabla anterior confirman este hecho. Cuando se alcanza el punto máximo de conjugación tan solo se forman 10 enlaces a 80°C, mientras que son 20 los originados a menores temperaturas. Con el resto de fracciones plasmáticas este cálculo no puede ser realizado, ya que están formadas por mezclas de varias proteínas de diferente secuencia.

Estos datos sugieren que se puede lograr un alto grado de conjugación a bajas temperaturas, pero que el tiempo necesario para ello es excesivamente largo, lo que no compensaría el coste de incrementar la temperatura de reacción en 5 o 10°C.

#### **4.2.2 Análisis de la electroforesis de los conjugados**

Para confirmar que el descenso observado del número de grupos amino libre era debido a la formación de glicoproteínas, se procedió a realizar una electroforesis en geles de acrilamida. La conjugación de las proteínas con dextrano de 10 kDa ocasiona que el peso molecular del conjugado sea mayor que el de la proteína nativa de procedencia. Por tanto, cuando la conjugación tiene lugar se deberían observar cambios en los patrones electroforéticos. Además, de manera secundaria se utilizó un método de tinción específico de glicoproteínas, el cual no es efectivo para proteínas que no contengan restos de hidratos de carbono de unidos por enlaces glicosídicos en su estructura. Comparando los patrones de tamaño y de tinción de los geles (mostrados en las Figuras 20 y 21) podremos determinar que efectivamente hay una relación directa entre el descenso de grupos amino libre y la formación del conjugado por la reacción de Maillard.



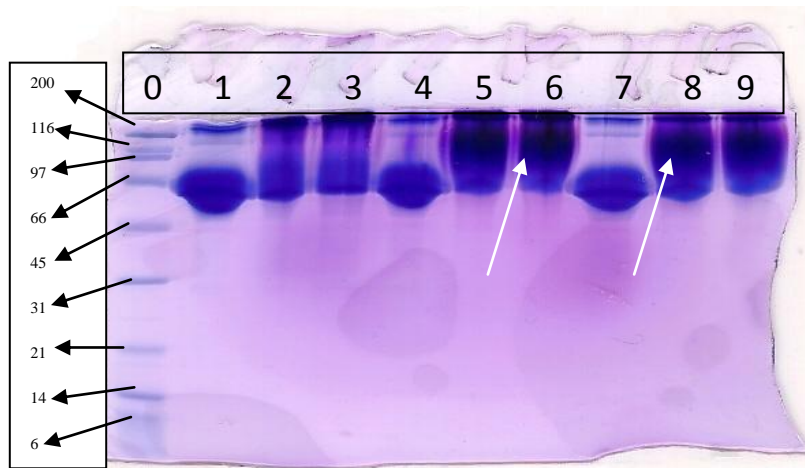


*Figura 20. Electroforesis de la evolución de la conjugación de la fracción FIII a 80°C. Tinción de proteína total (A) y duplicado con tinción específica de glicoproteínas (B). Calle 1: patrones de tamaño, en kDa, 2: proteínas nativas; calles de la 3 a la 7 diferentes tiempos de conjugación: 0.5, 1, 2, 6 y 24 horas*

En la Figura 20A se muestra como el tamaño de las proteínas de la fracción FIII (compuesta por  $\alpha$  y  $\beta$ - globulinas) se incrementa paulatinamente a medida que el grado de conjugación aumenta. La Figura 20B solo refleja la presencia de glicoproteínas, de ahí que no aparezcan los marcadores de tamaño en la primera calle de la electroforesis. Lo que se puede apreciar en ambas figuras es como a partir de las 2 horas de reacción a 80°C, se produce un incremento de la presencia de glicoproteínas de alto peso molecular (por encima de los 200 kDa), a expensas de las proteínas nativas de un menor peso. El dextrano posee un elevado peso molecular (10 kDa) por lo que unas pocas uniones sirven para modificar sustancialmente su peso molecular, lo cual queda en evidencia a la vista de los geles.

Algunas proteínas con un grado menor de conjugación aún permanecen visibles después de un largo periodo de incubación (6 y 24 horas). Como ya se indicó, estas

fracciones están compuestas por múltiples proteínas y no todas ellas alcanzarán el mismo grado de conjugación, por lo que no todas tendrán un alto peso molecular al final del proceso.



*Figura 21. Electroforesis de la evolución del tamaño molecular de la hemoglobina durante la conjugación a diferentes temperaturas. La calle 0 es el patrón de tamaños en kDa. Las calles 1, 4 y 7 muestran la proteína nativa; las calles 2-3, 5-6 y 8-9 son duplicados de muestras al tiempo final, tratadas a 80, 75 y 70°C respectivamente.*

En la Figura 21 se muestra la distribución final de los pesos moleculares de las glicoproteínas creadas a partir de la hemoglobina porcina. El patrón detectado es muy similar en los conjugados producidos a 75 y 70°C. Para ambas temperaturas se observa una gran banda, formada por glicoproteínas de un peso superior a los 150 kDa, la cual está ausente en los conjugados formados a 80°C. Esto confirma que, efectivamente, se han unido más moléculas de dextrano a la hemoglobina tratada a bajas temperaturas. Así a 70 y 75°C de media se unen 20 residuos de dextrano a la hemoglobina, lo que origina glicoproteínas de al menos 250 kDa. Sin embargo, las glicoproteínas producidas

a 80°C, tienen una media de 10 residuos de dextrano, lo que da lugar a moléculas de 150 kDa de peso medio, tal como se muestra en los geles.

Desde un punto de vista de una futura aplicación industrial, debe ser adquirido un compromiso entre el tiempo empleado y el grado de conjugación. Teniendo en cuenta todos los aspectos observados hasta el momento: (i) que a 70°C el tiempo empleado es más elevado (4 horas); (ii) que el grado de conjugación alcanzado a 70 y 80°C es similar (salvo en el caso de la hemoglobina) y (iii) a 80°C se requiere menos tiempo para obtener el grado de conjugación deseado, se seleccionó esta última temperatura para crear los conjugados cuyas propiedades funcionales y aplicabilidad van a ser analizadas a lo largo de esta tesis.

### **4.2.3 Propiedades funcionales de los conjugados**

Una vez analizado el grado de conjugación y determinadas las mejores condiciones para realizar la reacción, se realizaron los análisis pertinentes para cuantificar las propiedades funcionales de los conjugados. Posteriormente se compararon con las proteínas nativas ya analizadas en la sección anterior y se hizo un estudio de su aplicabilidad.

#### **4.2.3.1 Solubilidad**

Como ya se ha mencionado anteriormente, la solubilidad es el parámetro que va a tener una mayor influencia en el resto de las propiedades funcionales y por eso se analiza en primer lugar.

Los valores de solubilidad de los conjugados fueron analizados siguiendo el mismo protocolo empleado para las proteínas nativas. En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos.

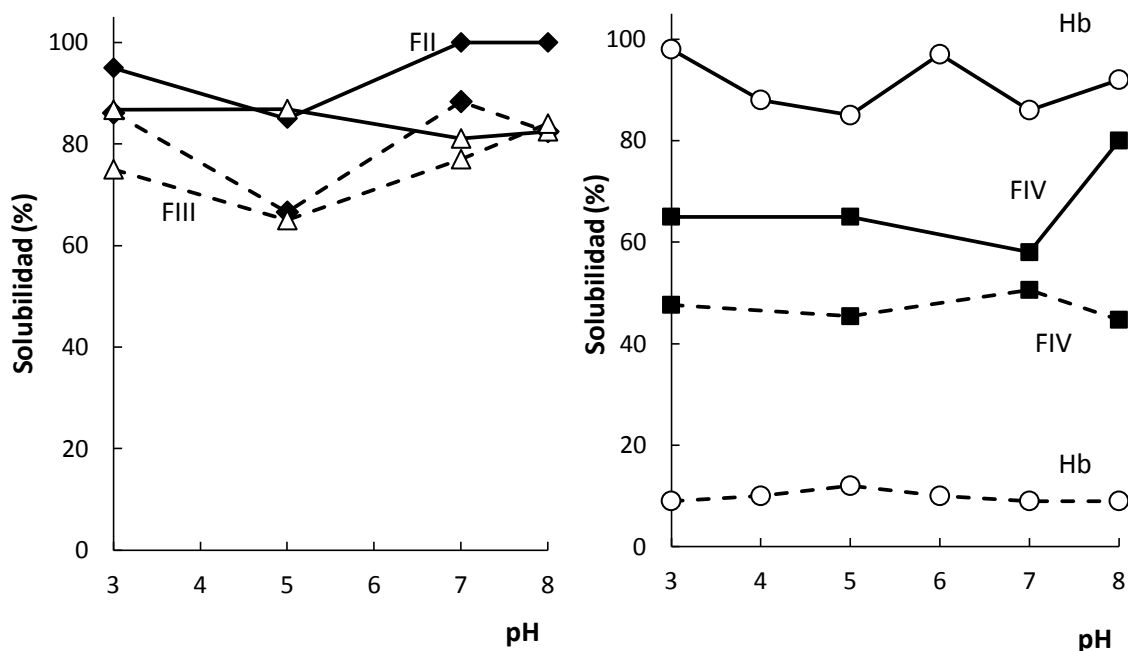


Figura 22. Solubilidad de las fracciones plasmáticas FII, FII y FIV y de la hemoglobina antes y después de la conjugación. Las líneas continuas (—) representan la solubilidad de las proteínas nativas y las discontinuas (- - -) la de las conjugadas.

En todos los conjugados producidos la solubilidad ha disminuido en mayor o menor grado con respecto a las proteínas nativas. Esta pérdida de solubilidad es causada por un alto grado de entrecruzamiento entre las proteínas, que origina la formación de agregados, y por un posible deterioro de la estructura de las proteínas debido al calentamiento al que son sometidos durante el proceso de conjugación. Este efecto conlleva a una precipitación de las proteínas, que es mucho más acusada en los conjugados que en las nativas. Ha sido documentado en la bibliografía<sup>64, 101</sup> que solo determinados grados de conjugación, específicos para cada proteína, producen un

incremento de la solubilidad. Fuera de este grado óptimo de conjugación la solubilidad puede no variar o incluso disminuir por debajo de los valores originales. En este trabajo la conjugación fue llevada a cabo hasta un punto máximo, que no necesariamente tiene que coincidir con el grado de conjugación adecuado para elevar la solubilidad. Por otro lado, en los trabajos citados, los incrementos de la solubilidad fueron detectados cuando se empleaban azúcares de bajo peso molecular (glucosa generalmente). Por tanto, los efectos que producen uno u otro hidrato de carbono en la solubilidad, pueden ser opuestos a causa de la gran diferencia de peso molecular.

Es posible que grados menores de conjugación a los alcanzados en ese trabajo no hubieran afectado negativamente a la solubilidad de las proteínas o que, incluso, la hubieran incrementado. No obstante, incluso llegando a grados de conjugación tan altos como los aquí mostrados, el descenso de la solubilidad es tan solo de un 15% en todo el rango de pH para las fracciones FII, FIII y FIV. No ocurre así con la hemoglobina, para la que la solubilidad decrece hasta un 80%, con respecto al valor original, tras la conjugación.

#### **4.2.3.2 Estabilidad térmica**

La estabilidad térmica puede calificarse como la conservación de la solubilidad que las proteínas presentan tras un tratamiento térmico. Un aumento de la temperatura en una disolución de proteínas conduce a su desnaturalización, agregación y por último precipitación de la misma por una pérdida de solubilidad. Por esto, para medir la estabilidad térmica se mide la cantidad de proteína que permanece en disolución tras un tratamiento térmico. La estabilidad térmica será, por tanto, un índice del mantenimiento de la solubilidad. La importancia de medir esta propiedad pasa por el hecho de que

muchos procesos de la industria alimentaria conllevan tratamientos térmicos, los cuales pueden dañar las proteínas haciendo que pierdan su estructura y que se precipiten. Si esto ocurriese, tanto su valor nutricional como su aplicabilidad disminuirían tras la exposición a altas temperaturas. En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos después de someter las diferentes fracciones a un tratamiento térmico de 15 minutos a 85°C. Los pH empleados para el estudio fueron 4 y 7, ya que son los habituales en la industria alimentaria.

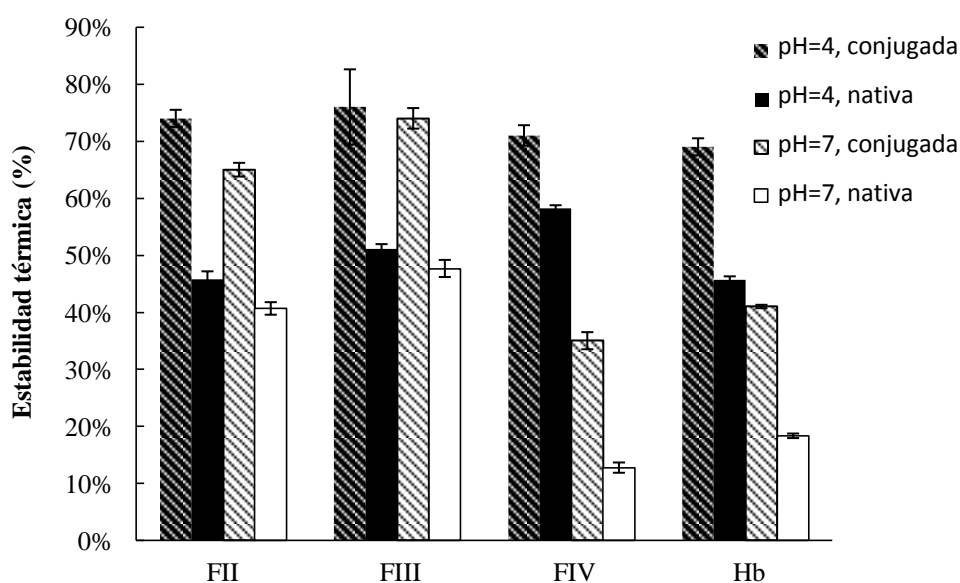


Figura 23. Estabilidad térmica de las proteínas nativas (colores lisos) y conjugadas (colores rayados) a pH 4 y 7, tras ser sometidas a tratamiento térmico (80°C, 15 min).

Para los dos pH estudiados, la estabilidad térmica es mejorada considerablemente en los conjugados si se compara con las proteínas nativas. Las fracciones FII y FIII, formadas por globulinas, presentan un comportamiento muy similar en todas las condiciones experimentales. Así, tanto a pH=4 como a pH=7 presentan una estabilidad que se sitúa entre el 40 y el 50% en su estado nativo, mientras que una vez conjugadas ésta sube hasta un 75%.

Por su parte, la hemoglobina y la albumina sérica (principal proteína de la fracción FIV), son las que presentan una mayor mejora en la estabilidad térmica después de la conjugación. Esa mayor estabilidad es más evidente a pH=7, pasando de unos valores iniciales del 15% a una estabilidad cercana al 40% en los conjugados. A pH=4 la mejora no es tan apreciable, pasando de un 50% y 60% en las nativas a un 70% de las ya conjugadas.

Por tanto, a pesar de que la solubilidad de las proteínas nativas es más elevada (como se constató en el Apartado 4.2.3.1 de esta memoria), cuando media un tratamiento térmico son los conjugados los que mejor mantienen su solubilidad. La precipitación debido al efecto de la temperatura ocurre por desnaturalización de las proteínas y posterior agregación y precipitación. Las moléculas de dextrano que se unen a las proteínas evitan las interacciones proteína/proteína que promueven la agregación y precipitación y además protegen la estructura nativa de la proteína. Diversos autores opinan que el dextrano disminuye la cantidad de solvente disponible para las proteínas, por lo que es forzada a mantenerse en un estado compacto, estado que previene la precipitación y por tanto mejora su solubilidad después del calentamiento<sup>102</sup>. Este efecto es conocido como “crowding effect”.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los conjugados son mucho más apropiados para aquellos procesos que requieran un tratamiento térmico. Si la solubilidad se conserva después de un calentamiento, el resto de propiedades funcionales que de ella dependen, también se verán conservadas.

**4.2.3.3 Propiedades gelificantes.**

Al igual que con las proteínas nativas, las propiedades gelificantes de los conjugados fueron estudiadas analizando tres parámetros distintos: LGC (concentración más baja a la que se forma un gel),  $T_{gel}$  (temperatura de gelificación) y resistencia máxima del gel a la deformación, que viene dado por el módulo elástico o  $G'$ . Los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente tabla:

*Tabla 18. Propiedades gelificantes de las proteínas nativas y conjugadas.*

	LGC % (p/v)		$T_{gel}$ (°C)		$G'_{max}$ (kPa)	
	Nativa	Conjugada	Nativa	Conjugado	Nativa	Conjugada
<b>FII</b>	2	10	44.8	69.6	$4 \cdot 10^4$	$1.85 \cdot 10^4$
<b>FIII</b>	2	10	56.9	71.8	$4.7 \cdot 10^4$	$2.58 \cdot 10^4$
<b>FIV</b>	4	12	67.7	82.4	$4.2 \cdot 10^3$	$1.8 \cdot 10^3$
<b>Hb</b>	n.d.	14	59.5	77.2	$2.35 \cdot 10^4$	$3.75 \cdot 10^3$

Cabe señalar que, a pesar de que a priori, los resultados obtenidos parecen señalar valores de LGC muy superiores en el caso de las proteínas conjugadas que para las nativas, en realidad la cantidad de proteína empleada para formar el gel es similar en ambos casos. Tal y como se indicó anteriormente, los conjugados fueron realizados a una proporción proteína/dextrano 1:3, lo cual quiere decir que un valor de LGC=10 en las fracciones FII y FIII conjugadas se correspondería a un LGC=3.3 en las fracciones nativas, que es un valor ligeramente superior al medido para éstas (LGC=2). Por otro lado, en el caso de la fracción FIV el resultado indica que se emplea realmente la misma



cantidad de proteína en ambos casos (nativa y conjugada) para lograr el gel. Por otro lado, es interesante señalar que la hemoglobina, solo fue capaz de formar geles estables cuando estaba conjugada.

El incremento observado de la cantidad de glicoproteínas necesaria para producir geles está íntimamente relacionado con la mayor estabilidad térmica de las proteínas. La formación de geles requiere una fase previa de agregación y precipitación de las proteínas, que como se ha visto, se reduce de forma considerable en el caso de los conjugados.

Del mismo modo que una mayor cantidad de glicoproteína es necesaria para la formación de geles con proteínas conjugadas, también es precisa una mayor temperatura para que las proteínas unidas a dextrano alcancen su temperatura de gelificación. En todos los casos se ha establecido que se precisan entre 12 y 15°C más para que los conjugados alcancen su temperatura de gelificación (Tabla 17). Al igual que ocurría con el caso del LGC, este aumento de la  $T_{gel}$  está estrechamente relacionado con el efecto protector que el dextrano ejerce sobre la proteína, el cual evita que ésta pierda su estructura tridimensional y por tanto se precipite. Con la obtención de las fracciones conjugadas, se ha conseguido ampliar el rango de  $T_{gel}$  de las proteínas sanguíneas que se sitúa entre 45 y 82°C, cuando anteriormente este rango oscilaba entre los 45 y los 67°C.

Por otro lado, uno de los efectos que el dextrano ejerce sobre los geles es que su resistencia a la deformación es mucho menor, posiblemente debido a efectos estéricos que impiden las interacciones proteína/proteína que dan fortaleza al gel. Para las fracciones FII, FIII y FIV conjugadas, el módulo de elasticidad  $G'$  es aproximadamente la mitad que para las fracciones nativas. Este descenso en la resistencia del gel a la

deformación es mucho más apreciable cuando se trata de la hemoglobina, para la que se constató una pérdida del módulo  $G'$ , tras su conjugación, del 85%.

Productos como sopas, cremas o comidas infantiles requieren el uso de gelificantes que tengan una consistencia blanda y poco viscosa, para lo que los conjugados pueden ser empleados.

#### **4.2.3.4 Análisis DSC**

La calorimetría diferencial de barrido es una técnica ampliamente utilizada para estudiar las transiciones térmicas de las proteínas, ya que ofrece información sobre como la proteína pasa de un estado nativo a un estado desnaturalizado producido por un tratamiento térmico. Cuando una proteína se desnaturaliza, el proceso viene acompañado por un significativo incremento del calor interno de la muestra, el cual se ve reflejado como un pico negativo en el termograma del DSC<sup>30</sup>. El mínimo de ese pico se corresponde con la temperatura a la que se produce la desnaturalización de la proteína en cuestión.

La temperatura de transición de los conjugados y de las proteínas nativas, obtenidas mediante DSC, se muestra en la Tabla 19. Se observa como la glicación de las proteínas provoca un incremento del 13% de la temperatura de transición, salvo en el caso de la fracción FIII donde el incremento se ve reducido a un 7%. Queda demostrado pues, que la conjugación ejerce un papel protector sobre la estructura conformacional de las proteínas, ya que es necesario emplear una mayor temperatura para provocar un cambio de estructura en las proteínas. Estos resultados concuerdan con los datos anteriormente mostrados sobre los cambios en  $T_{gel}$  y estabilidad térmica.

Tabla 19. Variación de la temperatura de transición en proteínas conjugadas.

	<b>Nativa</b>	<b>Conjugada</b>
<b>FII</b>	71.4	82.4
<b>FIII</b>	81.7	87.6
<b>FIV</b>	80.1	91.3
<b>Hb</b>	77.7	89.0

El análisis DSC indica unos valores de la temperatura de desnaturalización superiores a los obtenidos mediante la medida de la  $T_{gel}$ . Estas diferencias ha sido previamente descritas en diversos estudios<sup>68, 101</sup>. El que ambas temperaturas difieran en unos grados se debe a que cada uno de los métodos se basa en unas premisas distintas, con lo que el significado físico de ambas temperaturas no es exactamente el mismo. Así, las temperaturas obtenidas en los estudios reológicos están relacionadas con el primer paso de precipitación de las proteínas y con un incremento en las interacciones proteína/proteína que provoca su posterior agregación, y que conduce, por tanto, a la formación de la red del gel. Por otro lado, las temperaturas que se detectan en los ensayos de DSC están relacionadas con la temperatura de desnaturalización, proceso que ocurre principalmente justo después de la formación del gel.

#### 4.2.3.5 Capacidad emulsificante

A priori, la capacidad emulsionante es una de las propiedades que se verá afectada más favorablemente por la reacción de Maillard; ya que las proteínas poseen cierto carácter anfipático y su enlace con el dextrano (que es fuertemente hidrofílico)

incrementa esta anfipaticidad tan esencial para producir emulsiones. Los grupos hidrofóbicos de las proteínas son capaces de adsorber la fase lipídica, mientras que el dextrano puede fácilmente solvatar la fase acuosa. Los resultados para la capacidad emulsificante de las diferentes fracciones obtenidos (empleando 4 y 10 mg/mL de proteína) se reflejan en la siguiente Figura 24.

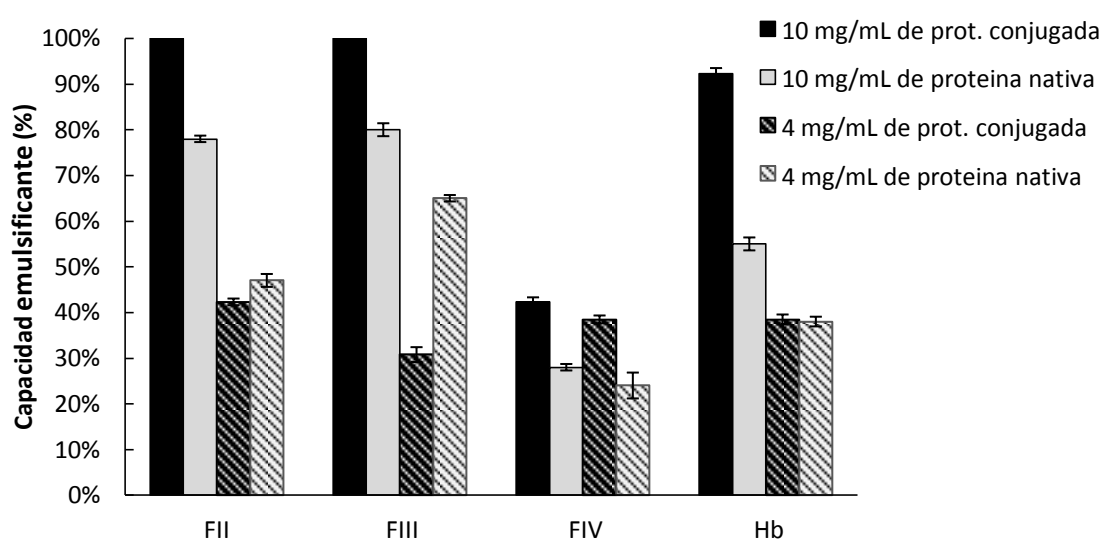


Figura 24. Capacidad emulsificante de proteínas nativas y conjugadas, empleando 4mg/mL de proteína (colores lisos) y 10 mg/mL de proteína (colores rayados).

Cuando se emplea una concentración de proteína conjugada de 10 mg/mL, existe un incremento significativo de la capacidad emulsificante. De hecho, las fracciones FII y FIII (formadas por globulinas) fueron capaces de emulsionar la totalidad del aceite empleado en el ensayo, (13 mL). Este incremento un aumento del 25% con respecto al dato obtenido de las proteínas nativas. Dada la facilidad con que las fracciones conjugadas FII y FIII han emulsionado el 100% del aceite empleado, cabe suponer que tendrían capacidad para emulsionar volúmenes mayores de aceite. La fracción FIV

nativa, presentaba en todos los ensayos la menor capacidad emulsionante, (28%), sin embargo, después de la conjugación, esta capacidad se vio incrementada hasta un 42%. Por su parte, la hemoglobina fue la fracción que mostró un mayor incremento una vez conjugada, pasando de una capacidad inicial de emulsión del aceite del 55% a una final del 92%.

Cuando la concentración de proteína empleada fue de 4 mg/mL, se produjeron diversos efectos según de qué proteína se tratara. Así, las fracciones hemoglobina y FIV aumentaron su capacidad emulsificante, mientras que en las fracciones FII y FIII se vio disminuida. Como ya se mencionó, tan solo una cuarta parte del conjugado está formado por proteína, siendo esta parte del conjugado la que aporta grupos hidrofóbicos capaces de adsorber la fase aceite de la emulsión. Por tanto, el emplear 4 mg/mL de conjugado FII y FIII tiene como consecuencia que la concentración de proteínas empleadas es pequeña, lo que supone una carencia de grupos hidrofóbicos, que no resultan suficientes para adsorber la totalidad del aceite empleado en el ensayo. Por otro lado, la fracción FIV (formada por albúmina sérica) y la hemoglobina poseen una gran concentración de aminoácidos no polares, es decir, aún empleando una concentración de 4 mg/mL de estos conjugados, existen los suficientes grupos hidrofóbicos como para que el efecto beneficioso del dextrano (que consiste en aumentar el carácter anfipático de la proteína) sea percibido. Como resultado, en el caso de la hemoglobina se conserva la capacidad emulsionante de la proteína nativa, e incluso se aprecia un efecto positivo de la conjugación en la capacidad emulsionante, que aumenta, en el caso de la fracción FIV.

#### 4.2.3.6 Resultados del IMC

La variación de energía en el sistema durante el proceso de conjugado se ha medido mediante microcalorimetría isoterma. En la Figura 25 se muestra la variación de la energía libre del sistema durante un proceso de conjugación entre la hemoglobina y el dextrano. El pico que se aprecia, tras aproximadamente 83 minutos de reacción, se debe a las variaciones de energía ocasionadas por la formación de los enlaces entre la proteína y el dextrano, y en procesos secundarios de la reacción de Maillard que originan la aparición de los productos de Amadori, AMP (productos avanzados de la reacción de Maillard) y otros productos que no están totalmente caracterizados<sup>86</sup>. Por tanto, debido a estas reacciones secundarias, no toda la energía detectada debe ser atribuida a la formación del enlace glucosídico.

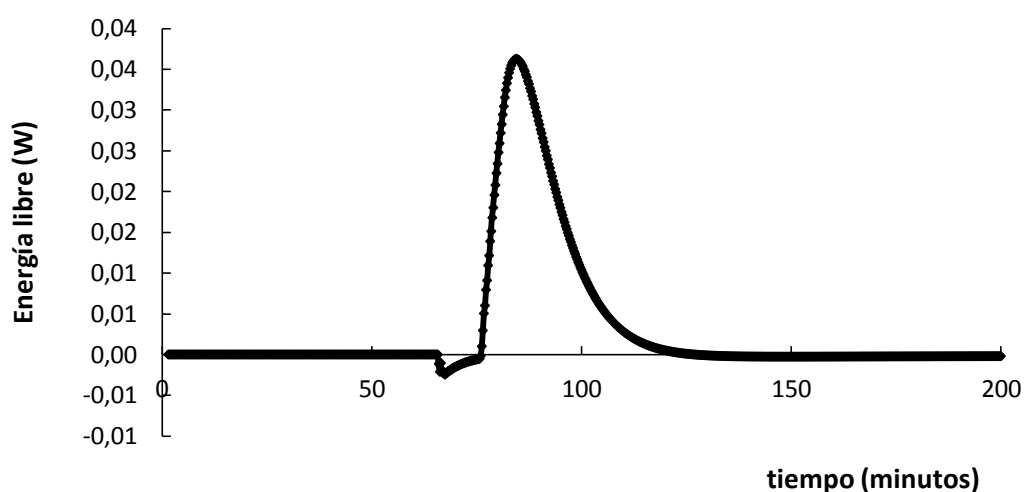


Figura 25. Variación de energía libre del sistema durante el proceso de conjugación de hemoglobina y dextrano a 60°C.

En todos los experimentos llevados a cabo, se apreciaba un elevado incremento de la energía libre del sistema a partir de los 70 minutos de haber colocado la muestra a

60°C. El valor medio obtenido del área encerrada en el pico, tras integrar la curva, arrojó un valor de entropía de  $\Delta H = -44.2 \pm 5.4$  J/g. Si este valor se relación con el peso molecular de la hemoglobina y lo expresamos en calorías obtendremos que  $\Delta H = -2800$  kcal/mol de hemoglobina. La energía de formación de los enlaces C=O y C=N es  $E = 90$  y  $147$  kcal/mol respectivamente. Se sabe que durante la fase temprana de la reacción de Maillard un enlace C=O se rompe mientras que un enlace C=N se forma, por tanto el balance de energía por cada molécula de dextrano que se une a la proteína es de  $\Delta E = -43$  kcal/mol. Suponiendo que toda la energía detectada ( $\Delta H$ ) fuera debida exclusivamente a la formación de enlaces glicosídicos ( $\Delta E$ ), podríamos averiguar el número de enlaces C=O rotos (ó C=N formados) durante la reacción de Maillard, aplicando la siguiente fórmula:

$$(\Delta H/\Delta E) = -2800 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} / -43 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} = 65 \text{ enlaces}$$

Por tanto la media de moléculas de dextrano unidas a la hemoglobina sería de 65 enlaces formados por cada molécula de hemoglobina. Sin embargo, los datos obtenidos experimentalmente, midiendo el descenso de grupos amino libres, apuntaban que el número de enlaces que se formaban eran de entre 10 y 20 en función de la temperatura; lo que se correspondería con un  $\Delta H$  comprendido entre  $-430$  y  $-860$  kcal/mol. Por tanto, entre el 70 y el 85 % de la energía detectada se debe a reacciones posteriores a la conjugación, dato que concuerda con lo esperado, puesto que a la formación del enlace glucosídico la preceden otras reacciones en cadena.

#### 4.2.3.7 Aplicaciones alimentarias de los conjugados

Las posibles aplicaciones de las proteínas modificadas, en base a sus propiedades funcionales, en la industria alimentaria se resumen en la Tabla 20.

Como se puede observar, el disponer de una mayor variedad de proteínas gracias a la conjugación, permite que estas puedan ser empleadas para diferentes propósitos a los indicados para las proteínas nativas. Además, la mayor estabilidad térmica de los conjugados permite su uso en procesos en los que altas temperaturas sean requeridas.

*Tabla 20. Posibles aplicaciones de las proteínas modificadas en la industria alimentaria.*

<b>Alimento</b>	<b>Propiedad funcional deseada</b>	<b>Proteína nativa más adecuada*</b>	<b>Conjugado más adecuado</b>
Productos cárnicos	Emulsificación, Solubilidad, gelificación	Globulinas	FII, FIII, FIV, Hb
Pasteles y bollería	Emulsificación	Plasma	FII, FIII, Hb
Galletas	Solubilidad	Hb, FIV	-
Yogures	Solubilidad, gelificación	Plasma, FIV	FII, FIII, FIV
Bebidas	Alta resistencia térmica	FIV	FII, FIII, FIV, Hb
Potajes, salsas	Emulsificación	FI, FII, FIII, Hb	FII, FIII, FIV, Hb
Confitería, chocolatería	Emulsificación	FI, FII, FIII, Hb	FII, FIII, FIV, Hb

\* ver capítulo 4.1 de los resultados



### **4.3 HIDROLISIS QUÍMICA ÁCIDA DE HEMOGLOBINA**

Después de analizar las propiedades funcionales de varias proteínas, entre ellas la hemoglobina y sus conjugados, se pensó en la posibilidad de realizar hidrolizados de esta proteína celular, pero con la premisa de utilizar técnicas y métodos que no empleen enzimas. El interés de producir hidrolizados ya ha sido comentado con detalle a lo largo del capítulo 2 de esta memoria. La hemoglobina fue escogida entre las restantes fracciones proteicas debido a que es la proteína más abundante de la sangre y a su facilidad de purificación, que implica que pueda ser empleada como modelo para seguir la evolución del proceso sin interferencias de otras proteínas. El primer método empleado fue la hidrólisis química ácida, utilizando para ello ácido clorhídrico y sulfúrico a diferentes concentraciones.

Dentro de este capítulo se ha evaluado la influencia de la temperatura y del medio de hidrólisis empleado en el rendimiento del proceso y tamaño medio de los péptidos obtenidos. Con los datos obtenidos, se ha podido realizar un modelo matemático que nos ha permitido calcular el valor de los parámetros cinéticos implicados en la reacción de hidrólisis química.

#### **4.3.1 Efecto de la temperatura**

Se ha evaluado la influencia de la temperatura en el tamaño medio de los péptidos obtenidos durante el proceso de hidrólisis ácida. Para ello se realizaron experimentos a 50 y 80°C. En la Figura 26 se representa el tamaño medio de los péptidos durante el proceso de hidrólisis cuando se emplea un medio de hidrólisis de 6 M de HCl como agente químico para su producción. Se encontró que no hubo

diferencias entre el tamaño final de los péptidos formados a pesar de la variación de temperatura. Un aumento de 30°C en la temperatura de la reacción produce una disminución considerable del tiempo necesario para llevar a cabo la hidrólisis. De modo que de un tiempo de partida de 20 horas a 50°C, se pasó a necesitarse tan solo 5 horas cuando se incrementó la temperatura del proceso hasta 80°C. Como era esperado, un incremento de la temperatura disminuye el tiempo al que se alcanza un tamaño promedio constante, el cual se estableció en 15-17 kDa en ambos experimentos.

Debido a que el proceso transcurría más lentamente a 50°C, se tomó esta temperatura como referencia para analizar los cambios que se producen durante el proceso de hidrólisis.

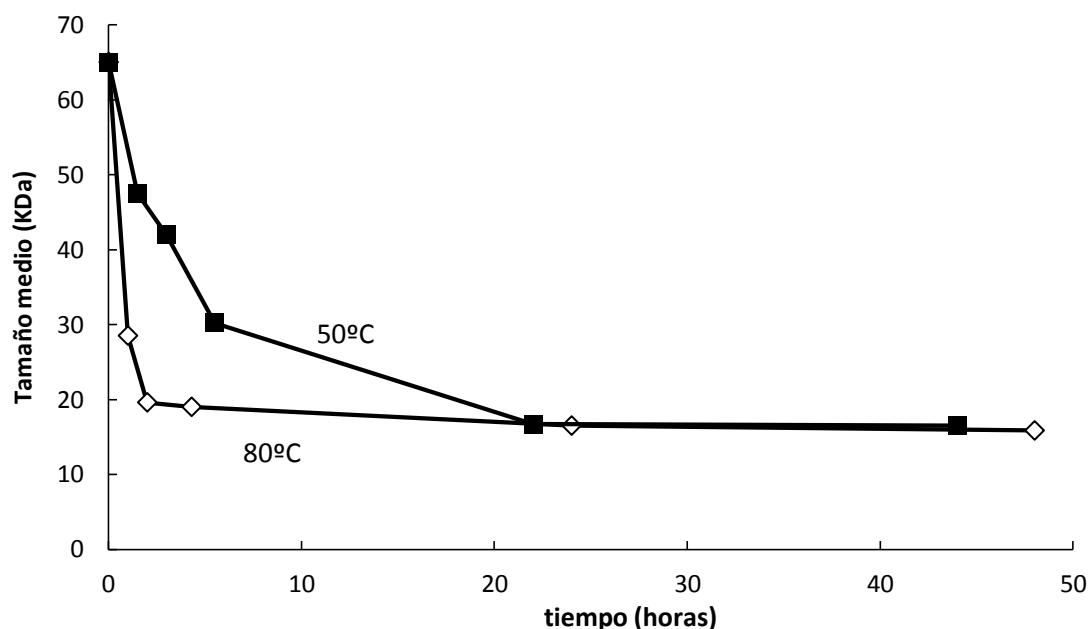


Figura 26. Evolución del tamaño medio de los péptidos obtenidos con HCl 6 M a diferentes temperaturas: 50°C y 80°C.

### 4.3.2 Análisis de las fracciones.

Una vez establecida la temperatura de reacción, los experimentos se realizaron empleando tanto HCl, como H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a las concentraciones señaladas en el apartado de metodología: 6, 3 y 1 molar. Como ya se ha comentado, al extraer las muestras se detectaron dos fases diferentes, una sólida y otra líquida. Por tanto, los resultados se han dividido para analizar individualmente cada una de las diferentes fracciones encontradas, que eran: hemoglobina (Hb), péptidos solubles (SP), compuestos no solubles (NSP) y amino ácidos (Aa).

#### 4.3.2.1 Cuantificación de aminoácidos (Aa)

Los aminoácidos son detectados desde los primeros momentos del proceso hidrolítico. Proviene del ataque del ácido al extremo terminal de los péptidos y la hemoglobina nativa.

En el caso del ácido sulfúrico tan solo un 6% de la cantidad inicial de hemoglobina es transformada en aminoácidos libres, mientras que cuando se usa ácido clorhídrico cerca de un 11 % del peso inicial es transformado en aminoácidos. Por otro lado, cuando la concentración de ácido disminuye también lo hace la cantidad de aminoácidos producidos. A pesar de que el objetivo final de esta hidrólisis es la producción de péptidos, los aminoácidos favorecen la digestibilidad del producto por lo que su presencia no repercute de forma negativa en el objetivo buscado mediante de este proceso.

#### 4.3.2.2 Cuantificación de proteína no soluble (NSP)

Cuando las muestras extraídas del reactor se centrifugaban, aparecía un precipitado originado por los compuestos no solubles, también denominados NSP. Este precipitado está formado por proteína no soluble y por las sales que se formaban durante la neutralización del medio ácido. Por ello, previamente a ser cuantificada, la fracción NSP se lavó varias veces para eliminar las sales que podían interferir en los análisis de peso seco.

Al mezclar la proteína en contacto con el ácido aparecen grandes agregados que pueden ser vistos a simple vista. Se ha referenciado en la literatura<sup>76</sup> que la globina hidrolizada durante 30 minutos con ácido cítrico forma grandes agregados (sobre unos 800 kDa), compuesto por varias subunidades de globina unidas entre sí. Estos agregados están estabilizados por enlaces no covalentes, especialmente interacciones hidrofóbicas, que son esenciales para la formación de los mismos. Estas interacciones entre la hemoglobina, las subunidades de la misma y los péptidos originan la aparición de agregados en las primeras fases del proceso. Otros autores<sup>75, 121</sup>, recogen que los procesos de hidrólisis y medios de pH ácido conducen a interacciones débiles entre el grupo hemo y los péptidos, lo cual promueve una intensa polimerización de estos compuestos y la consiguiente formación de agregados y polímeros.

Durante la primera media hora de reacción es pues, cuando la mayor cantidad de proteínas y péptidos no solubles son detectados. Después de este periodo inicial los agregados comienzan a disgregarse, lo que ocurre a diferentes tiempos según la concentración empleada. Por ejemplo, 20-25 minutos son necesarios bajo concentraciones 6M y más de 60 minutos cuando las concentraciones empleadas son menores (1- 3 M). A pesar de que los agregados ya no son visibles a partir de ese

#### 4.- Resultados y Discusión

##### Hidrólisis química ácida de hemoglobina

momento, una cierta proporción de la proteína permanece en estado no soluble en todos los experimentos realizados. La evolución de los NSP bajo diferentes condiciones es recogida en la Tabla 21.

*Tabla 21. Evolución de los NSP durante la hidrólisis bajo diferentes tratamientos ácidos.*

<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6M</b>		<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M</b>		<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M</b>		<b>HCl 6M</b>		<b>HCl 3M</b>	
tiempo	NSP	tiempo	NSP	tiempo	NSP	tiempo	NSP	tiempo	NSP
(min)	(mg/mL)	(min)	(mg/mL)	(min)	(mg/mL)	(min)	(mg/mL)	(min)	(mg/mL)
<b>10</b>	13.8±0.28	<b>30</b>	15.7±0.24	<b>10</b>	36.5±0.88	<b>10</b>	11.1±0.16	<b>10</b>	17.5±0.24
<b>30</b>	25.5±0.36	<b>90</b>	16.5±0.23	<b>30</b>	30.4±0.91	<b>30</b>	26.8±0.31	<b>30</b>	36.4±1.35
<b>90</b>	29.4±0.31	<b>150</b>	12.4±0.19	<b>90</b>	16.6±0.17	<b>90</b>	27.5±0.34	<b>90</b>	12.7±0.13
<b>150</b>	26.5±0.35	<b>210</b>	11.7±0.14	<b>150</b>	12.5±0.21	<b>180</b>	19.0±0.16	<b>150</b>	7.4±0.08
<b>360</b>	18.0±0.14	<b>990</b>	7.6±0.09	<b>420</b>	11.5±0.25	<b>360</b>	12.0±0.09	<b>420</b>	2.1±0.04
<b>1440</b>	16.3±0.15			<b>1440</b>	8.1±0.12	<b>1440</b>	7.5±0.10	<b>1440</b>	2.1±0.07

En la Tabla 21 se puede observar como la mayor cantidad de NSP es siempre detectada cuando las concentraciones de ácido empleadas son más elevadas. Por otro lado, hay una mayor concentración de NSP cuanto más fuerte sea el ácido usado.

Para conocer la composición de los NSP, éstos fueron resuspendidos en una disolución de ácido trifluoroacético al 1% v/v, y posteriormente fueron analizados en un sistema HPLC. Los perfiles cromatográficos obtenidos fueron comparados con muestras procedente de la parte soluble y tratadas de igual modo. Los resultados mostraron que no había diferencias apreciables entre ambas fracciones, es decir, los NSP estaban formados por restos de hemoglobina sin hidrolizar y por péptidos con un perfil cromatográfico muy similar a los que estaban en estado soluble. Este hecho nos induce

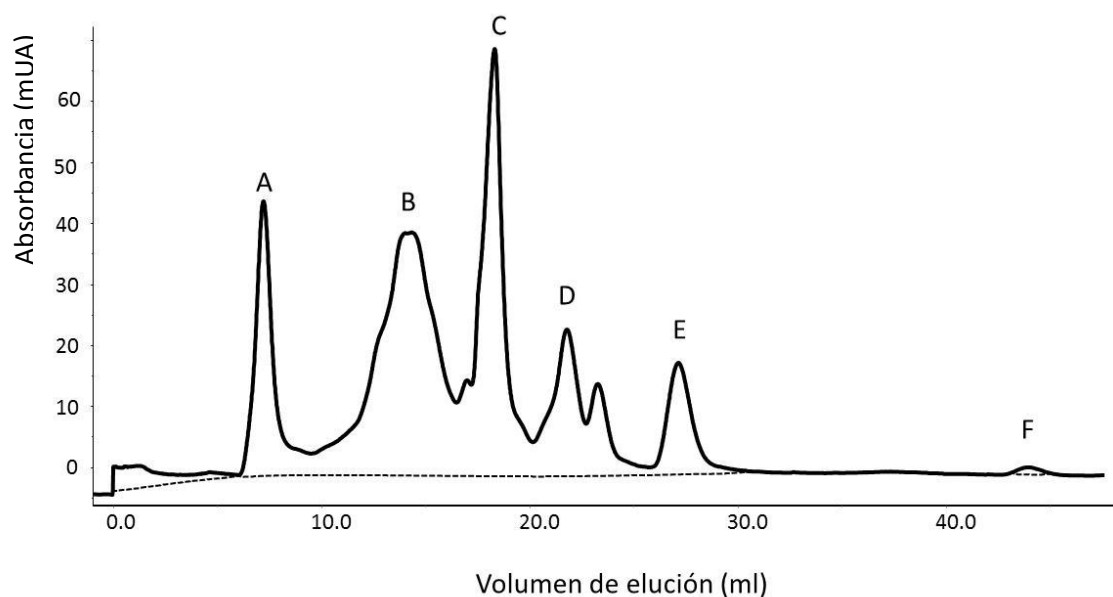
a pensar que los mismos péptidos y proteínas que forman la fracción soluble son los que están presentes, aunque en una forma precipitada y agregada, en la fracción no soluble.

Debido al efecto de los ácidos empleados, los péptidos que forman los agregados se rompen en aminoácidos y en péptidos de menor tamaño. Por esta causa, ya que las interacciones hidrofóbicas que los estabilizan se ven debilitadas, la estabilidad del agregado se ve comprometida. Si los nuevos péptidos formados a partir de los agregados son de un tamaño suficiente, éstos pueden volver a agregarse a través de interacciones hidrofóbicas, tanto entre ellos, como con la propia hemoglobina presente. Así pues, se establece un equilibrio entre los péptidos solubles y los no solubles y la hemoglobina. Por tanto, los agregados pueden dar lugar a péptidos solubles y de ahí que se vea una disminución de los NSP durante el proceso a expensas de un incremento de la fracción soluble como se verá en el siguiente apartado de este capítulo.

#### 4.3.2.3 Cuantificación de péptidos solubles (SP)

La cuantificación de los péptidos solubles se realizó mediante análisis cromatográfico, utilizando la técnica de exclusión de tamaño. El análisis daba como resultado un cromatograma con una serie de picos bien diferenciados entre sí. La Figura 27 recoge el cromatograma que se obtuvo para una de las muestras. Los picos detectados, cuyos volúmenes de elución se dan entre paréntesis, correspondían a los siguientes tamaños moleculares: A (8.9 mL) = 65 kDa, B (14.3mL) = 20 kDa, C (18.8 mL)= 10.5 kDa, D (21.8 mL)=7.3 kDa y E (27.2 mL)=4.3 kDa. Estos picos fueron encontrados en todos los experimentos realizados con ambos ácidos: clorhídrico y sulfúrico, variando el área de cada uno de los picos en función del tiempo y el ácido

empleado. El último pico (F), se corresponde a un peso molecular muy bajo, el cual está formado por aminoácidos aromáticos, detectados específicamente a 280 nm.



*Figura 27. Cromatograma de la fracción de péptidos solubles obtenidos tras 6 horas de hidrólisis con ácido sulfúrico 6 M.*

La evolución de la cantidad de péptidos solubles durante el tiempo de hidrólisis y la distribución de los péptidos según sus tamaños se recogen en las Tablas 22 y 23. De acuerdo con las tablas mostradas, la hidrólisis que se realizó a las concentraciones más altas de ácido ofreció los mejores resultados desde el punto de vista de producción de péptidos de bajo peso molecular. Fue en estos casos donde el tamaño medio de los péptidos obtenidos fue el más bajo, situándose en 17 y 23 kDa cuando se emplea ácido sulfúrico y clorhídrico respectivamente. Bajo estas condiciones, los péptidos de un tamaño entre 10 y 20 kDa fueron los más abundantes, esto es debido a que las subunidades de la hemoglobina tienen un tamaño de 16 y 17 kDa y el proceso hidrolítico lo primero que origina es la ruptura de la estructura cuaternaria de esa

proteína. A medida que el proceso transcurre las subunidades van perdiendo aminoácidos de sus extremos y su tamaño disminuye, dando lugar a péptidos de menor tamaño. Los fragmentos proteicos que se detectaron en un rango superior de tamaño, de más de 20 kDa, pueden estar formados por la unión de varios péptidos, de varias subunidades de hemoglobina o de una combinación de ambos. Esto da lugar a péptidos de tamaño molecular de 30, 40 o 50 kDa, dependiendo del número de subunidades y péptidos que se hayan agregado. Este fenómeno no es muy habitual y solo se observa en las hidrólisis realizadas a baja concentración de ácido. La gran mayoría de los péptidos detectados se encuentran en el rango de tamaño de las subunidades o inferior.

*Tabla 22. Evolución de la cantidad de péptidos solubles (SP) durante el tiempo de hidrólisis. La cantidad inicial de hemoglobina es de 50 mg/mL.*

<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6M</b>		<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M</b>		<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M</b>		<b>HCl 6M</b>		<b>HCl 3M</b>	
<b>tiempo</b>	<b>Sp</b>	<b>tiempo</b>	<b>SP</b>	<b>tiempo</b>	<b>SP</b>	<b>tiempo</b>	<b>SP</b>	<b>tiempo</b>	<b>SP</b>
<b>(min)</b>	<b>(mg/mL)</b>	<b>(min)</b>	<b>(mg/mL)</b>	<b>(min)</b>	<b>(mg/mL)</b>	<b>(min)</b>	<b>(mg/mL)</b>	<b>(min)</b>	<b>(mg/mL)</b>
<b>10</b>	8.54±0.18	<b>10</b>	1.70±0.04	<b>10</b>	0.70±0.06	<b>30</b>	4.95±0.15	<b>10</b>	8.20±0.11
<b>30</b>	14.25±0.26	<b>30</b>	1.88±0.03	<b>30</b>	1.01±0.07	<b>60</b>	5.00±0.19	<b>30</b>	4.26±0.09
<b>90</b>	16.51±0.37	<b>90</b>	7.16±0.09	<b>90</b>	1.29±0.05	<b>120</b>	12.20±0.24	<b>90</b>	36.83±1.11
<b>150</b>	18.23±0.14	<b>150</b>	6.46±0.08	<b>150</b>	1.82±0.14	<b>180</b>	18.06±0.28	<b>150</b>	44.10±1.05
<b>210</b>	24.53±0.39	<b>210</b>	12.28±0.26	<b>420</b>	7.93±0.21	<b>360</b>	28.80±0.31	<b>1440</b>	46.40±1.29
<b>1440</b>	30.78±0.67	<b>990</b>	13.28±0.21	<b>1440</b>	14.37±0.31	<b>1440</b>	36.70±0.41		



#### 4.- Resultados y Discusión

##### Hidrólisis química ácida de hemoglobina

*Tabla 23. Composición según su tamaño de los péptidos obtenidos tras 24 horas de hidrólisis bajo diferentes medios.*

Tamaño (kDa)	Medio de hidrólisis				
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3M	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1M	HCl 6M	HCl 3M
<b>60-70</b>	0	5	43	0	70
<b>50-60</b>	1	7	11	0	7
<b>40-50</b>	4	8	8	0	6
<b>30-40</b>	7	11	10	2	6
<b>20-30</b>	7	14	10	18	5
<b>10-20</b>	67	40	15	57	4
<b>&lt;10</b>	14	14	3	22	2
<b>Tamaño medio (kDa)</b>	<b>17.3</b>	<b>25.0</b>	<b>46.1</b>	<b>23.3</b>	<b>56.3</b>

En cuanto al rendimiento de la reacción de hidrólisis puede observarse que el ácido sulfúrico produce un 60% de péptidos solubles a partir de la concentración original de hemoglobina. El ácido clorhídrico, a pesar de provocar un mayor rendimiento, produce péptidos de mayor tamaño medio. Esto es debido a que, al ser un ácido más débil, produce una menor tasa de hidrólisis con lo que permanecen una mayor cantidad de péptidos en disolución, pero éstos tienen un mayor peso molecular.

Se debe señalar que cuando el ácido sulfúrico es empleado a bajas concentraciones (1M), produce una mayor cantidad de péptidos solubles que a concentraciones intermedias. Sin embargo, a bajas concentraciones de este ácido, el tamaño final de los péptidos es claramente mayor, ya que cerca de un 45% de la hemoglobina permanece con su tamaño original. Lo mismo ocurre cuando una concentración de ácido clorhídrico 3M es utilizada, siendo este efecto aún más

acentuado al ser un ácido más débil. Así, cuando se hidrolizó mediante HCl 3M sólo un 30% de la hemoglobina fue transformada en péptidos o aminoácidos, aunque se conseguía que el 90% de la proteína inicial empleada permaneciera soluble, bien en su estado nativo o en forma de péptido. Es decir, existe un compromiso entre el tamaño final de los péptidos obtenidos y la solubilidad final del producto. A mayor concentración de ácido se consiguen péptidos más pequeños, pero la producción de agregados proteicos también es incrementada y por tanto el rendimiento del proceso disminuye.

#### 4.3.2.4 Evolución del peso molecular de SP

El seguimiento del tamaño de los péptidos y su concentración cuando se emplean concentraciones de ácido sulfúrico y clorhídrico 6 M durante el proceso de hidrólisis se refleja en la Figura 28. En dicha figura se observa como la hemoglobina paulatinamente desaparece del medio de hidrólisis dando lugar a péptidos de diferentes pesos moleculares.

En las primeras fases, para tiempos de hidrólisis de 85 y 180 minutos (Figura 28A y 28B) los péptidos son detectados en cada rango de tamaño estudiado: desde hemoglobina nativa hasta péptidos de muy bajo peso molecular (en torno a los 3 kDa) pasando por los de un tamaño comprendido entre 10 y 20 kDa, que son los más abundantes. Estos péptidos se corresponden con la primera fase de separación de las subunidades alfa y beta de la hemoglobina.

En fases más avanzadas (Figura 28C y 28D), se puede observar cómo se van acumulando los péptidos de un tamaño inferior, con respecto a los observados en las fases iniciales. En estas gráficas se indica la concentración de péptidos en cada franja de

#### 4.- Resultados y Discusión

##### Hidrólisis química ácida de hemoglobina

peso molecular, en el eje se sitúan de mayor a menor tamaño de izquierda a derecha, respetando así el orden de elución en el que aparecen en el cromatograma obtenido en el equipo FPLC. Tanto cuando se emplea ácido clorhídrico como sulfúrico, la distribución de tamaños es muy similar. A las 24 horas de reacción los péptidos de 15 kDa son los más abundantes, siendo su concentración de 20 mg/mL cuando se emplea ácido sulfúrico y 21 mg/mL cuando se usa ácido clorhídrico.

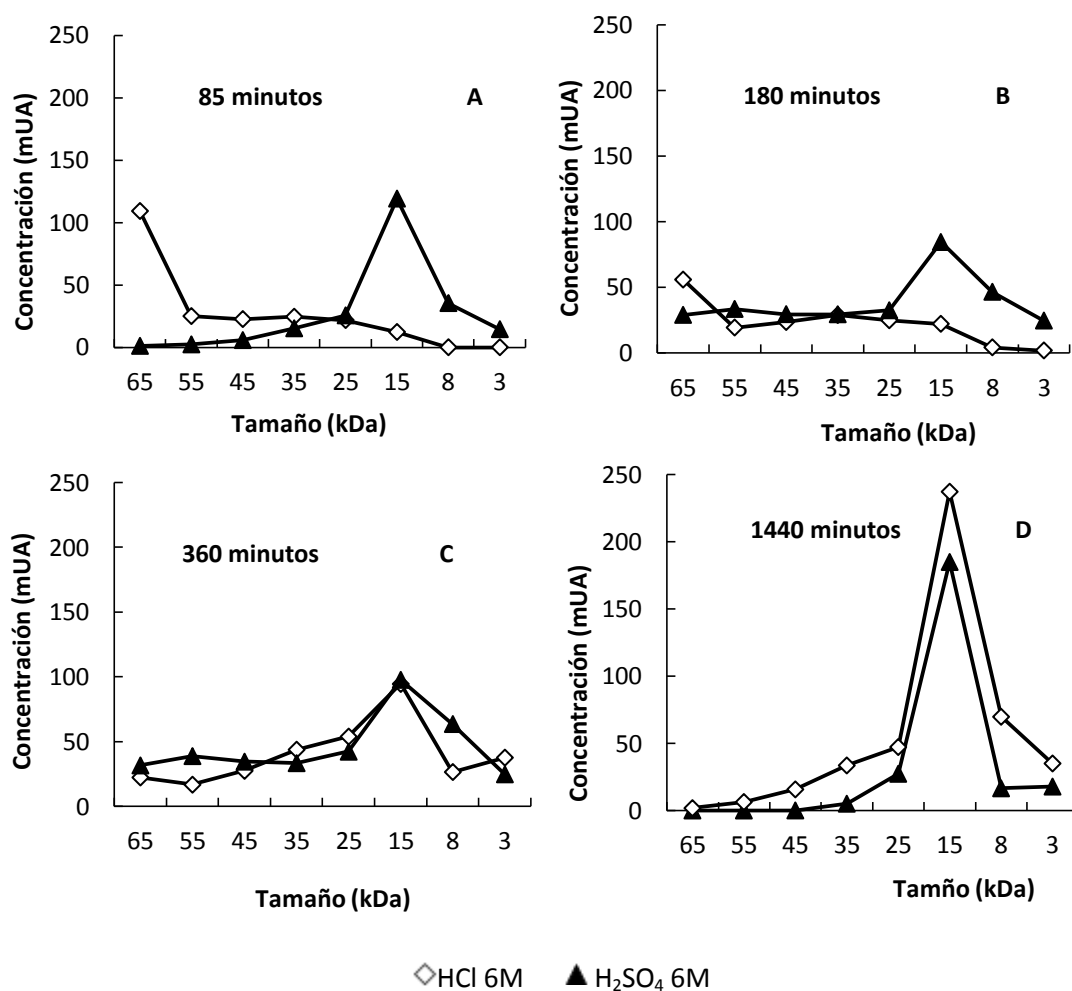


Figura 28. Evolución de la composición de la fracción SP en función del tamaño de los péptidos que la forman. Las gráficas representan diferentes tiempos de reacción: (A) 85 min, (B) 180 min, (C) 360 min y (D) 1440min.

### 4.3.3 Modelo cinético de la hidrólisis ácida de hemoglobina

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se procedió a la elaboración de un modelo cinético para poder comparar las velocidades de reacción implicadas en la hidrólisis de la hemoglobina en función del ácido empleado. Los valores usados son un compendio de la evolución de las fracciones Hb, SP, NSP y Aa con el tiempo, bajo condiciones fuertes de hidrólisis, esto es ácido sulfúrico y clorhídrico 6 molar.

*Tabla 24. Abundancia relativa, expresada en tanto por 1 de su fracción en peso, de las cuatro fracciones obtenidas durante la hidrólisis ácida de la hemoglobina a 50°C empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6M y HCl 6M.*

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6 M					HCl 6M				
Tiempo (min)	Hb	Sp	NSP	AA	Tiempo (min)	Hb	SP	NSP	AA
<b>10</b>	0.54	0.17	0.28	0.01	<b>30</b>	0.48	0.1	0.42	0
<b>30</b>	0.20	0.28	0.51	0.01	<b>90</b>	0.31	0.13	0.55	0.01
<b>90</b>	0.10	0.31	0.57	0.02	<b>180</b>	0.25	0.36	0.38	0.01
<b>150</b>	0.08	0.36	0.53	0.03	<b>240</b>	0.22	0.44	0.33	0.01
<b>210</b>	0.08	0.49	0.39	0.04	<b>360</b>	0.16	0.58	0.23	0.03
<b>1440</b>	0.00	0.60	0.33	0.07	<b>1440</b>	0.01	0.73	0.15	0.11

En la Figura 29 se plantean las reacciones que el presente trabajo propone para explicar las posibles relaciones que las fracciones analizadas tienen entre sí. El modelo cinético fue desarrollado a partir de este esquema.

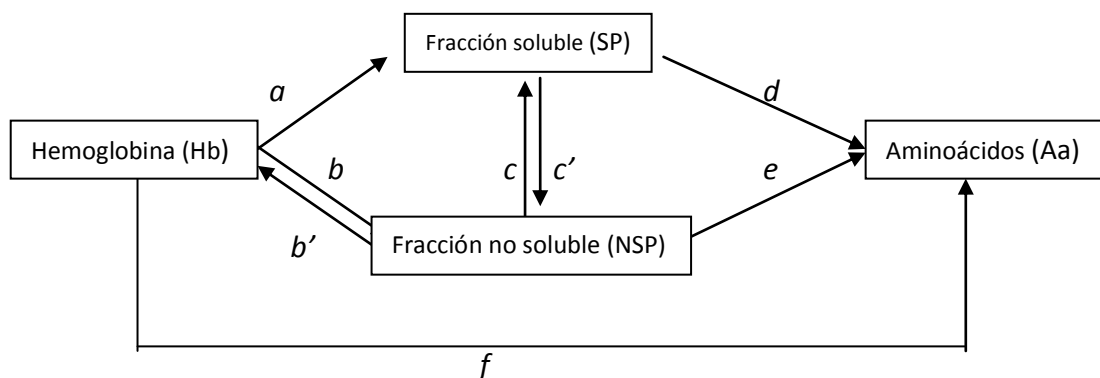


Figura 29. Rutas de las reacciones que tienen lugar durante la hidrólisis ácida de la hemoglobina.

El modelo toma en consideración que la hemoglobina puede ser hidrolizada directamente a péptidos solubles de menor tamaño (vía  $a$ ), o que puede producir aminoácidos directamente por ruptura del enlace peptídico en sus extremos terminales (vía  $f$ ). Los aminoácidos además, pueden tener otros dos orígenes, uno de ellos es a partir de la fracción no soluble y el otro procedente de los péptidos que están en forma soluble; el mecanismo para ambos casos es el mismo que para los aminoácidos provenientes de la hemoglobina (vías  $d$  y  $e$ ).

Por otro lado, como se comentó anteriormente, debido a la formación y destrucción de agregados y polímeros estabilizados por interacciones hidrofóbicas se producen dos equilibrios

- Uno entre la hemoglobina soluble y la hemoglobina precipitada (valorada dentro de la fracción NSP), determinados por el cociente  $b/b'$
- Otro entre los péptidos solubles y los no solubles (analizados en conjunto con la hemoglobina precipitada en la fracción NSP), determinado por el cociente  $c/c'$ .

Asumiendo estas hipótesis y teniendo en consideración que las reacciones no son reversibles y que a tiempo cero solo hay presencia de hemoglobina nativa soluble, el modelo de hidrólisis propuesto, basado en las rutas de la Figura 29, se plasma en las siguientes ecuaciones:

$$\frac{dC_{Hb}}{dt} = -(k_a + k_b + k_f)C_{Hb} + k_{b'}C_{NSP} \quad (4.1)$$

$$\frac{dC_{SP}}{dt} = k_a C_{Hb} + k_c C_{NSP} - k_d C_{SP} - k_{c'} C_{SP} \quad (4.2)$$

$$\frac{dC_{NSP}}{dt} = k_b C_{Hb} + k_{c'} C_{SP} - (k_{b'} + k_c + k_e) C_{NSP} \quad (4.3)$$

$$\frac{dC_{Aa}}{dt} = k_d C_{SP} + k_e C_{NSP} + k_f C_{Hb} \quad (4.4)$$

En dónde:

$k_x$  es la constante cinética correspondiente con cada una de las rutas mostradas en el modelo, donde  $x = a, b, b', c, c', d, e, f$

$C_{Hb}$ ,  $C_{NSP}$ ,  $C_{SP}$  y  $C_{Aa}$  son las concentraciones de hemoglobina, péptidos no solubles, péptidos soluble y aminoácidos, respectivamente

Los valores obtenidos mediante simulación para cada una de las constantes cinéticas se muestran en la Tabla 25. Estas constantes fueron determinadas utilizando el programa informático MicroMath® Scientist® 2.0.

*Tabla 25. Valores de las constantes cinéticas ( $k_x$ ) obtenidas para la hidrólisis con HCl 6M y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6M, basado en el modelo cinético propuesto. Los valores están expresados en h<sup>-1</sup>.*

Constante	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6M	HCl 6M
<b>k<sub>a</sub></b>	0.0155	0.0050
<b>k<sub>b</sub></b>	0.0415	0.0321
<b>k<sub>b</sub>'</b>	0.0057	0.0225
<b>k<sub>c</sub></b>	0.0016	0.0004
<b>k<sub>c</sub>'</b>	0.0016	0.0004
<b>k<sub>d</sub></b>	0.00005	0.0001
<b>k<sub>e</sub></b>	-	-
<b>k<sub>f</sub></b>	0.0011	5.0·10 <sup>-5</sup>
<b>R<sup>2</sup></b>	0.98	0.99

En la Figura 30 se muestran los datos reales obtenidos y la predicción del modelo para las diferentes fracciones usando las constantes cinéticas halladas con el software. A la vista de esta figura, resulta evidente que los datos experimentales se ajustan a los teóricos obtenidos con el programa informático, dando el R<sup>2</sup> un valor de 0.98 y 0.99 para la hidrólisis con sulfúrico y clorhídrico respectivamente. Es decir, el modelo propuesto es adecuado ya que presenta un buen ajuste con los datos experimentales.

4.- Resultados y Discusión  
Hidrólisis química ácida de hemoglobina

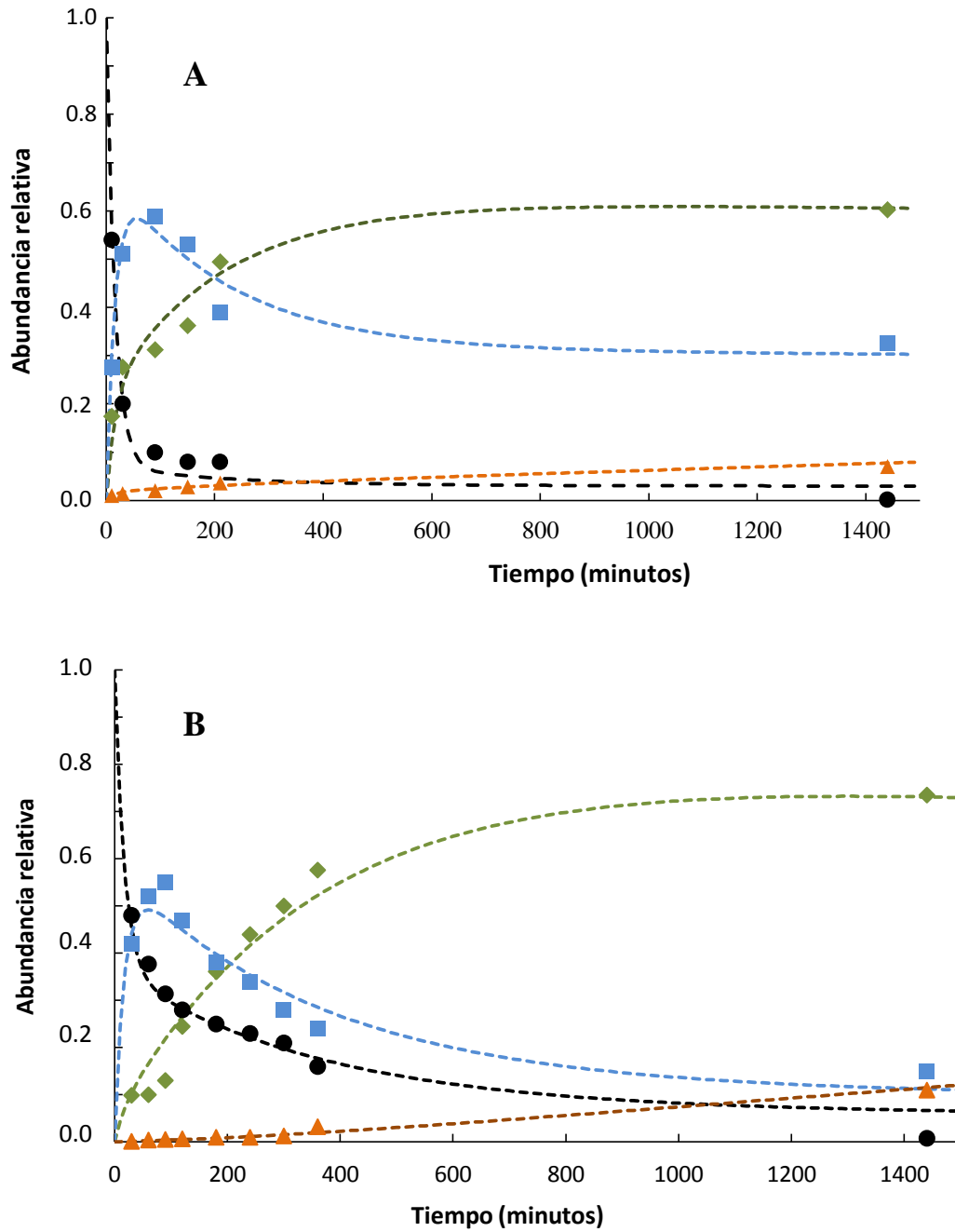


Figura 30. Valores reales de abundancia relativa de las fracciones estudiadas (símbolos) y valores obtenidos con el modelo informáticos (líneas discontinuas) para hidrólisis con ácido sulfúrico 6M (A) y ácido clorhídrico 6 M (B) a 50°C. Hemoglobina: ●, NSP: ■, SP: ◆ y Aa: ▲.



En ambas gráficas se muestra un comportamiento muy similar entre las dos, independientemente de que la hidrólisis haya tenido lugar utilizando ácido sulfúrico o clorhídrico. Sin embargo, el emplear uno u otro medio ácido sí tiene influencia en los valores finales de abundancia relativa alcanzados para cada una de las fracciones. A la vista de las gráficas puede apreciarse como los cambios más drásticos tienen lugar en las 6-7 primeras horas de reacción, durante las cuales las variaciones en la abundancia relativa de cada una de las fracciones son notables. Esto se debe a que es en estas primeras horas cuando se produce la precipitación y redisolución de la hemoglobina hasta que se alcanza un equilibrio, con lo que se incrementan los péptidos solubles y los aminoácidos libres, a expensas de un descenso de la hemoglobina nativa y de la fracción precipitada. A partir de esas 7 horas de reacción la abundancia relativa de cada una de las fracciones permanece prácticamente constante.

Sea cual sea el ácido empleado para la hidrólisis, la velocidad de insolubilización de la hemoglobina es la más elevada de todas, estando un orden de magnitud por encima de la de cualquier otra fracción. Esto concuerda con los resultados observados previamente, cuando en las primeras fases de la hidrólisis se apreciaba la formación de precipitados de gran tamaño en el medio de reacción. La relación  $k_b'/k_b$  nos da una idea de cómo se comporta el equilibrio de precipitación y redisolución de la hemoglobina, ya que cuando mayor sea el valor de dicha relación más desplazado estará el equilibrio hacia la redisolución de la hemoglobina. Este cociente tiene un valor de 0.13 en el caso de hidrolizar con ácido sulfúrico y de 0.70 cuando se usa ácido clorhídrico. Esto significa que la velocidad de redisolución de la hemoglobina es más elevada cuando la hidrólisis se realiza en ácido clorhídrico, con lo que los precipitados

desaparecen antes en dicho medio y, como consecuencia, la cantidad de NSP producidos será menor y el rendimiento de SP se verá incrementado.

La velocidad de producción de fracción SP viene determinada por la constante  $k_a$ , la cual es tres veces superior cuando se emplea ácido sulfúrico como agente hidrolizante. Sin embargo, al haber menor cantidad de hemoglobina disponible en este medio, la producción final de péptidos solubles no es tan elevada como en el caso de realizar la hidrólisis con ácido clorhídrico.

Por último, los aminoácidos proceden en su gran mayoría bien de la hemoglobina soluble o bien de los péptidos en disolución. Teniendo en cuenta que estas dos fracciones son más abundantes en el caso de emplear ácido clorhídrico, es lógico que los aminoácidos se produzcan en mayor medida cuando se trabaja con ácido clorhídrico.

#### **4.4 HIDROLISIS QUÍMICA BÁSICA DE HEMOGLOBINA**

Anteriormente se estudió la posibilidad de crear hidrolizados de hemoglobina usando ácidos como mecanismo de ruptura de los enlaces peptídicos. Como se reflejó en la sección 2.9.2 de esta memoria, la hidrólisis ácida destruye aminoácidos que la hidrólisis básica preserva y viceversa<sup>50, 92</sup>. Además, en ambos tipos de hidrólisis se requiere un paso posterior de neutralización para detener la hidrólisis, por lo que se ha de mezclar el medio ácido con otro básico o viceversa. En este trabajo se plantea como un método de ahorro de materiales y de tiempo la posibilidad de realizar dos procesos en paralelo para neutralizar el uno con el otro. Para ello, se estudió la formación de péptidos a partir de la hemoglobina usando altas concentraciones de hidróxido sódico como medio hidrolizante.

En esta sección se exponen los resultados obtenidos al utilizar NaOH como agente químico de hidrólisis. Para ello se evaluaron tres concentraciones de NaOH: 9, 6 y 3 M, a una temperatura de 50°C y una concentración inicial de sustrato de 50 mg/mL, valores iguales a los empleados en la sección previa, cuando se usaba un ácido como agente de hidrólisis.

##### **4.4.1 Análisis de las fracciones**

Como en el caso de la hidrólisis ácida, se observó que las muestras hidrolizadas estaban formadas por cuatro fracciones SP, NSP, Aa, así como la presencia de cierta cantidad de hemoglobina soluble. En la Figura 31 se muestra la evolución de estas fracciones según la concentración de NaOH empleada.

## Hidrólisis química básica de hemoglobina

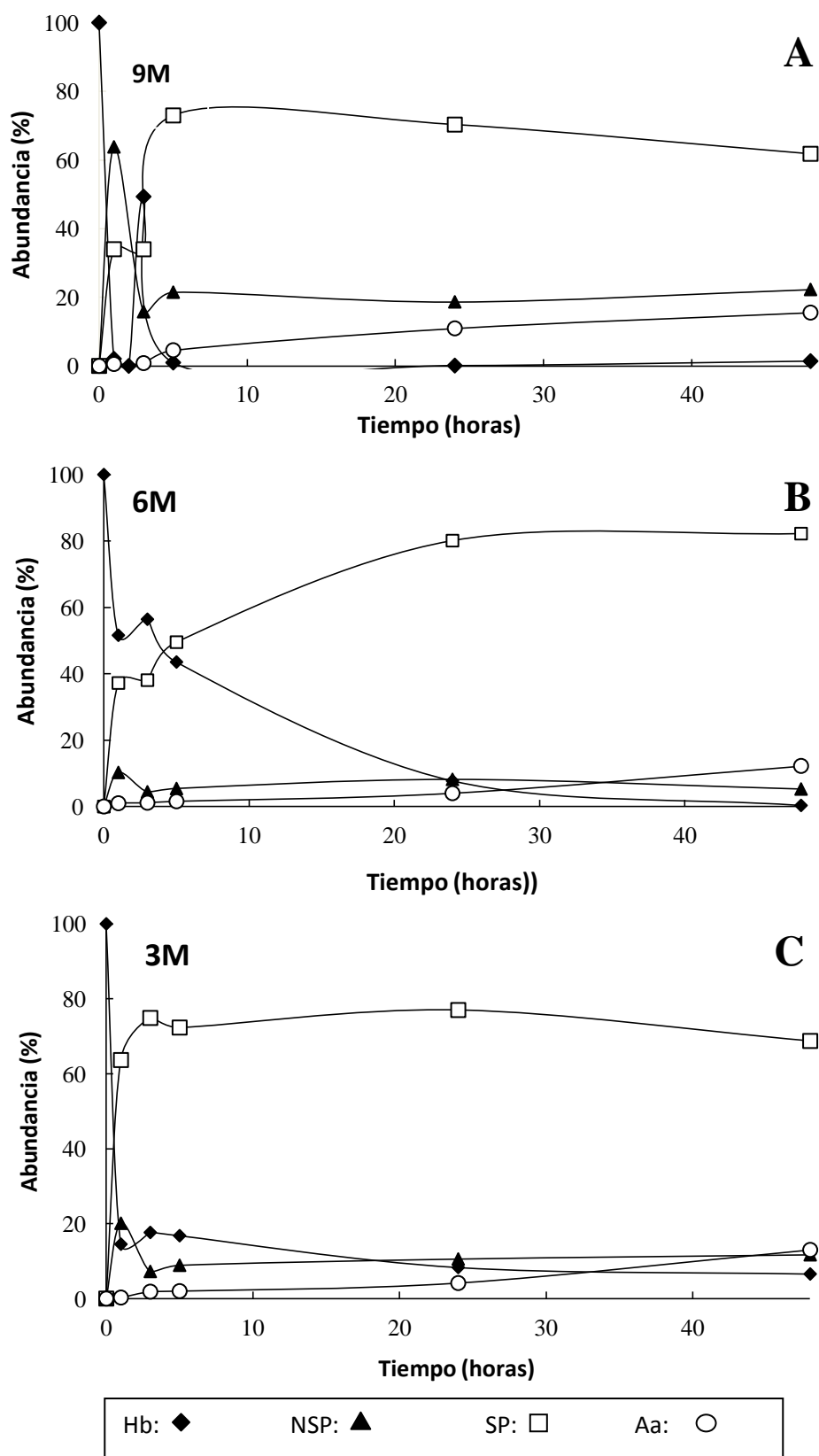


Figura 31. Evolución de las fracciones hemoglobina, NSP, SP y Aa bajo diferentes concentraciones de sosa: (A) 9M, (B) 6M y (C) 3M.

Cada una de ellas será estudiada con más detenimiento en los siguientes apartados.

#### 4.4.1.1 Cuantificación de Aa

Por la naturaleza de la reacción, los aminoácidos aparecen de manera inevitable a lo largo del proceso, a pesar de que no se persigue la producción de estos compuestos. En la siguiente tabla se muestra la evolución de la concentración de los aminoácidos con el tiempo bajo diferentes concentraciones de sosa.

*Tabla 26. Cantidad de aminoácidos producidos durante el proceso de hidrólisis a diferentes concentraciones de NaOH. Se expresan como porcentaje de la cantidad inicial de hemoglobina.*

		Abundancia de aminoácidos (% en peso)					
		Tiempo (horas)					
		0	1	3	5	24	48
[NaOH]	9 M	0	0.56	0.82	4.58	10.94	15.54
	6 M	0	0.97	1.12	1.56	4.00	12.22
	3 M	0	0.28	1.85	1.99	4.14	13.00

La producción de aminoácidos es muy similar en todos los ensayos realizados, a pesar de la diferente cantidad de NaOH empleada. En estos casos se producen más aminoácidos que cuando se emplean ácidos como agentes hidrolizantes, llegando a acumularse el doble de concentración de aminoácidos a tiempos finales.

## 4.4.1.2 Cuantificación de NSP

En la Tabla 27 se recogen los datos obtenidos de abundancia relativa para la fracción NSP, en función de la concentración de sosa utilizada y el tiempo de hidrólisis empleado.

*Tabla 27. Porcentaje de hemoglobina transformada en NSP a diferentes tiempos y concentraciones de sosa.*

		<b>Abundancia de NSP (% en peso)</b>					
		<b>Tiempo (horas)</b>					
		<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>24</b>	<b>48</b>
<b>[NaOH]</b>	<b>9 M</b>	0	63.41	12.31	21.48	18.66	22.27
	<b>6 M</b>	0	10.25	4.41	5.42	6.17	5.26
	<b>3 M</b>	0	20.09	7.24	8.89	10.56	11.69

La mayor cantidad de precipitados se detectaron siempre en las etapas iniciales de la hidrólisis, fenómeno que también ocurría con el uso de ácidos como agentes hidrolizantes. En todas las muestras analizadas las menores concentraciones de NSP se encontraron cuando se empleaban concentraciones de NaOH 6M, seguido por la hidrólisis 3M (en la que se duplica la concentración de NSP obtenida por hidrólisis 6M) y, por último la hidrólisis 9M (que cuadruplica dichas concentraciones de NSP). Esto es debido al efecto del NaOH sobre la producción de precipitados y su posterior solubilización. A altas concentraciones de NaOH (9M), la precipitación ocurre de manera casi inmediata y los agregados que se forman difícilmente se disgregan, debido al gran número de interacciones hidrofóbicas que los forman que son capaces de estabilizar los agregados. Esta estabilidad del agregado puede ser debido, posiblemente, a un desplegamiento total de la cadena polipeptídica, que provoca la exposición de

muchos más grupos al agente hidrolizante, y entre los que se forman enlaces hidrofóbicos. Por el contrario, a bajas concentraciones de NaOH (3M), a pesar de que las interacciones hidrofóbicas no son tan numerosas y que, por tanto, el agregado formado es más susceptible de ser desestabilizado, la sosa presente no es capaz de romper los enlaces formados y los agregados prevalecen durante el ensayo. Sin embargo, a concentraciones intermedias (6M) se observa un cierto equilibrio entre la estabilidad del agregado formado por las proteína y la capacidad del medio para romperlo y disgregarlo. Tal es así, que la concentración de precipitado permanece casi constante durante todo el proceso, a excepción de las dos primeras horas donde el contacto inicial del NaOH con la hemoglobina provoca una rápida agregación y precipitación.

Se resuspendieron muestras de esta fracción (NSP) en ácido trifluoroacético para comprobar su composición. A continuación se analizaron por HPLC, técnica que demostró que estaban compuestas por hemoglobina sin hidrolizar y por péptidos precipitados, al igual que ocurría cuando se emplean agentes ácidos de hidrólisis. Se pudo comprobar que el perfil cromatográfico de estos péptidos precipitados era coincidente con los que permanecían en disolución en las diferentes muestras tomadas en el tiempo. Por tanto, de nuevo, un equilibrio de precipitación/solubilización se establecía entre las fracciones Hb/NSP y SP/NSP.

#### 4.4.1.3 Análisis cuantitativo de la fracción soluble

La evolución de la fracción soluble, compuesta por péptidos y hemoglobina no hidrolizada, se muestra en las Tablas 28 y 29. Los valores reflejados en la primera se

corresponden con la concentración de hemoglobina disuelta y los de la segunda con la de los péptidos analizados por exclusión de tamaño en un sistema FPLC.

Tabla 28. Porcentaje de hemoglobina que permanece soluble y sin hidrolizar a lo largo del proceso de hidrólisis básica.

		Abundancia de hemoglobina solubles (% en peso)					
		Tiempo (horas)					
		0	1	3	5	24	48
[NaOH]	9 M	0	2.07	49.32	0.97	0.11	1.41
	6 M	0	51.58	56.40	43.52	7.74	0.32
	3 M	0	14.51	17.64	16.78	8.30	6.56

Tabla 29. Concentración de péptidos solubles a lo largo de la hidrólisis básica, expresados como porcentaje de la cantidad inicial de hemoglobina.

		Abundancia de péptidos solubles (% en peso)					
		Tiempo (horas)					
		0	1	3	5	24	48
[NaOH]	9 M	0	34.00	33.98	72.97	70.30	61.79
	6 M	0	37.20	38.05	49.50	80.09	82.20
	3 M	0	63.66	74.89	72.33	77.01	68.75

Tal como fue señalado en la sección anterior (apartado 4.3), la hemoglobina forma agregados insolubles al contacto con el ácido empleado como agente hidrolizante; este mismo efecto pudo ser observado al emplear la base como hidrolizante. A altas concentraciones de álcali se observa cómo tras un descenso casi



total de la hemoglobina en la primera hora de reacción, se produjo un incremento de la concentración de hemoglobina al cabo de 3 horas de hidrólisis. Este hecho, junto con el análisis de los agregados por HPLC, sugiere que la hemoglobina precipitada es posteriormente solubilizada, pasando a estar disponible para su hidrólisis y producir así péptidos y aminoácidos. Este efecto de precipitación y posterior redisolución es más evidente cuanto más alta es la concentración de la base empleada como agente de hidrólisis.

En el medio formado por NaOH 3M, la hemoglobina forma pequeños agregados, pero la mayoría permanece en estado soluble, sin que se apreciara una gran cantidad de materia no soluble. Por el contrario, cuando la concentración de NaOH empleadas era 6M o 9M, se observó gran porcentaje de materia insoluble. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de la hemoglobina para ser hidrolizada, los péptidos que se forman son de gran tamaño, por lo que no se consigue el objetivo de producir péptidos de bajo peso molecular. Como en el resto de experimentos, se observa un incremento de la hemoglobina soluble a tiempos medios de hidrólisis, que procede de los agregados que se desestabilizan. Para tiempos mayores, a pesar de que la hemoglobina continúa siendo hidrolizada, nunca deja de estar presente debido al aporte desde la fracción NSP. Aun así, al final del proceso de hidrólisis se detectaron bajas cantidades de hemoglobina soluble, i.e. un 0.3% y un 1.4% de hemoglobina inalterada cuando se usaba 6M y 9M de NaOH, respectivamente. Por su parte, en los ensayos en los que se utilizó una concentración de sosa 3M el porcentaje de hemoglobina nativa se elevaba hasta un 6.5%. El resto de la hemoglobina inicial es transformada en péptidos (solubles o no) y en aminoácidos, dando el mejor rendimiento la hidrólisis llevada a cabo con una

concentración 6M de sosa. En este caso en particular hasta un 82% de la hemoglobina fue transformada en péptidos solubles.

A pesar de que el proceso se prolongó hasta las 48 horas de reacción, a partir de las 24 horas de hidrólisis ya sólo un 8% de la hemoglobina permanece en estado nativo, es decir, a las 24 horas se alcanzaba un valor muy próximo al valor más alto de péptidos producidos. Es, por tanto, este tiempo de 24 horas el considerado como idóneo para detener el proceso, ya que alargar el tiempo de hidrólisis no implica un mayor rendimiento ni un descenso del tamaño medio de los péptidos.

#### 4.4.1.4 Evolución del tamaño de los péptidos solubles.

A medida que el proceso de hidrólisis avanza, el tamaño medio de los péptidos disminuye como resultado del ataque de la base a los enlaces peptídicos de la proteína. De forma general, este ataque se produce en los extremos de las cadenas de aminoácidos, ya que se observa un descenso progresivo del tamaño de los péptidos, seguido de un incremento de la concentración de aminoácidos libres. Es decir, el proceso tiene lugar de forma diferente a cuando se realiza una hidrólisis enzimática, en la que se produce una aparición de péptidos de menor tamaño. No obstante, péptidos de un tamaño de entre 1 y 10 kDa fueron detectados, por lo tuvo lugar la ruptura de ciertos enlaces intramoleculares, aunque de manera minoritaria. En la Figura 32 se muestra el cambio del peso medio molecular de los péptidos solubles.

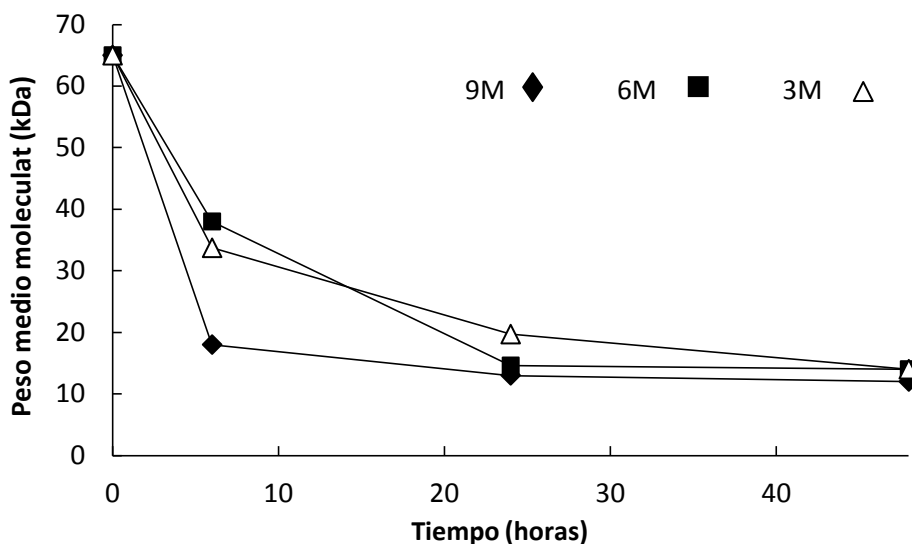
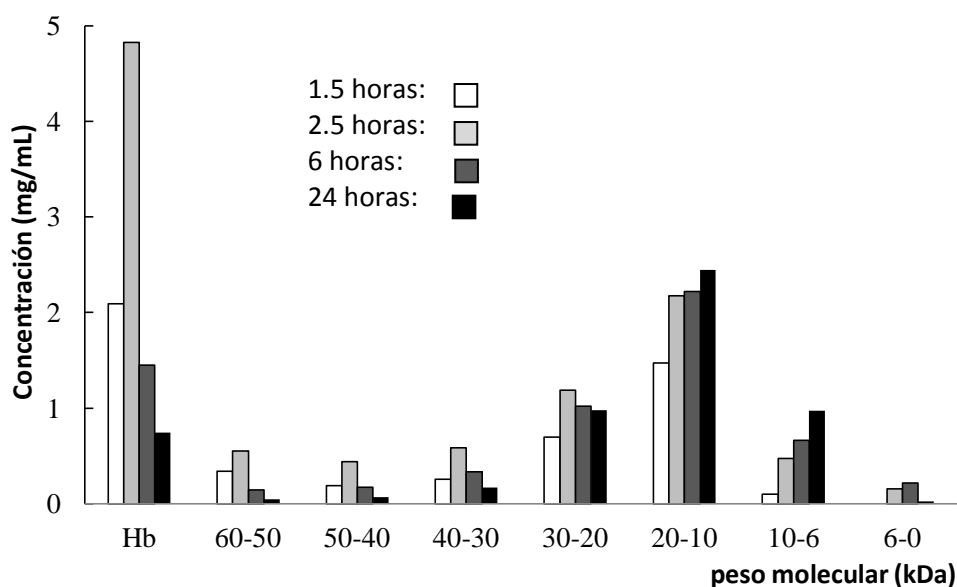


Figura 32. Evolución del tamaño medio de los péptidos con el tiempo bajo diferentes concentraciones de sosa.

Como era de esperar, la concentración de álcali empleado es inversamente proporcional al tamaño medio de los péptidos producidos, al menos en las primeras horas, dónde la diferencia de tamaño es mucho más apreciable. En la sexta hora del proceso los tamaños medios de los péptidos son 18, 38 y 34 kDa para concentraciones de NaOH 9, 6 y 3M respectivamente. Si este mismo análisis se realiza a las 24 horas de reacción, vemos que las diferencias de tamaño molecular se han reducido, situándose los valores dentro del rango de 14 a 20 kDa. Finalmente, cuando la reacción se detiene, los tamaños observados son de aproximadamente 14 kDa independientemente de la concentración de NaOH empleada; es decir, el tamaño medio de los péptidos permanece prácticamente constante en las últimas 24 horas de reacción. Por tanto, desde un punto de vista del tamaño medio, la concentración de NaOH empleada no tiene influencia si el proceso se alarga el tiempo suficiente.

Se puede determinar que el punto idóneo para detener la hidrólisis es a las 24 horas de haber comenzado, ya que alargar el proceso no conduce a una disminución significativa del tamaño de los péptidos, a excepción de cuando se emplea NaOH 3M, donde aún se puede apreciar un ligero descenso de este valor al pasar de 24 a 48 horas de hidrólisis.

A continuación se realizó un análisis pormenorizado del tamaño de los péptidos obtenidos a concentraciones de NaOH 6M. Las concentraciones de los diferentes péptidos(en relación con su tamaño) y de la hemoglobina fueron monitorizadas, y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 33.



*Figura 33. Evolución en la concentración de hemoglobina y péptidos de diferente tamaño durante la hidrólisis básica 6M. Los tiempos están expresados en horas*

El comportamiento de la hemoglobina disuelta y el de los péptidos de un tamaño superior a los 20 kDa es muy similar. Durante las 2 primeras horas sufren un incremento en su concentración, debido a la redisolución de la proteína procedente de la fracción NSP. A partir de este momento la concentración de hemoglobina y péptidos de

mayor tamaño disminuye, ya que la hidrólisis hace que se transformen en péptidos de menor peso molecular o que los agregados formados se rompan. Por otro lado, la concentración de los péptidos menores de 20 kDa (que incluyen a las subunidades alfa y beta) aumenta durante todo el proceso. Como se puede apreciar a la vista de la Figura 33, la fracción mayoritaria al final del proceso es aquella formada por péptidos de un tamaño comprendido entre 10 y 20 kDa.

#### 4.4.2 Modelo cinético de la hidrólisis química básica

Para finalizar el estudio del proceso de hidrólisis básica, se propone un modelo cinético similar al ya desarrollado para la hidrólisis ácida, pues los procesos de hidrólisis llevados a cabo son idénticos. Así, durante la hidrólisis básica tienen lugar los siguientes procesos, representados en la Figura 34:

- Precipitación de hemoglobina y péptidos solubles
- Redisolución de hemoglobina y de los péptidos no solubles
- Ruptura de los péptidos por los extremos para producir aminoácidos

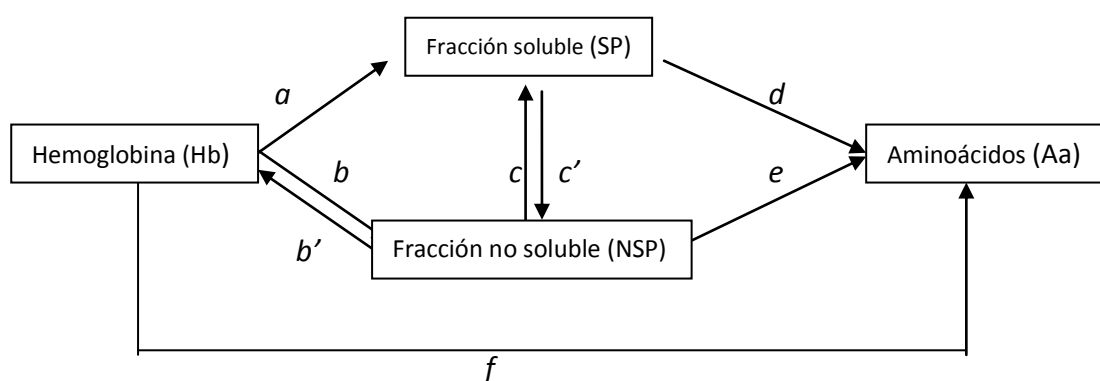


Figura 34. Rutas de las reacciones que tienen lugar durante la hidrólisis alcalina de la hemoglobina.

Por tanto las reacciones involucradas, que se vuelven a presentar a continuación, son las mismas que las indicadas para la hidrólisis ácida:

$$\frac{dC_{Hb}}{dt} = -(k_a + k_b + k_f)C_{Hb} + k_b' C_{NSP} \quad (4.1)$$

$$\frac{dC_{SP}}{dt} = k_a C_{Hb} + k_c C_{NSP} - k_d C_{SP} - k_c' C_{SP} \quad (4.2)$$

$$\frac{dC_{NSP}}{dt} = k_b C_{Hb} + k_c' C_{SP} - (k_b' + k_c + k_e) C_{NSP} \quad (4.3)$$

$$\frac{dC_{Aa}}{dt} = k_d C_{SP} + k_e C_{NSP} + k_f C_{Hb} \quad (4.4)$$

Dónde cada constante cinética,  $k_x$ , se corresponde con cada una de las rutas mostradas en el modelo. Los valores  $C_{Hb}$ ,  $C_{NSP}$ ,  $C_{SP}$  y  $C_{Aa}$  son los correspondientes a las concentraciones de hemoglobina, no solubles, soluble y aminoácidos, respectivamente. A tiempo cero solo hay presente hemoglobina soluble.

El modelo fue aplicado a los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de NaOH empleadas, a fin de conocer para cada una ellas el valor de las diferentes constantes cinéticas involucradas. Los datos previamente presentados (Figura 31) se han recogido y resumido en la Tabla 31; estos datos son los que se han empleado para obtener los valores de las constantes cinéticas del modelo propuesto.

#### 4.- Resultados y Discusión

##### Hidrólisis química básica de hemoglobina

Tabla 30. Porcentaje de cada fracción detectada durante la hidrólisis básica a diferentes concentraciones de NaOH.

		Abundancia (%)											
[NaOH]		9M				6M				3M			
	Fracción	Hb	SP	NSP	AA	Hb	SP	NSP	AA	Hb	SP	NSP	AA
tiempo (h)	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
	1	2	34	63	1	52	37	10	1	15	64	20	1
	3	49	34	16	1	57	38	4	1	17	74	7	2
	5	1	73	21	5	44	49	5	2	17	72	9	2
	24	0	70	19	11	8	80	8	4	8	77	11	4
	48	1	62	22	15	1	82	5	12	6	69	12	13

El mismo software usado para el modelo de hidrólisis ácida fue empleado para calcular los valores de las constantes en el modelo de hidrólisis básica. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 31.

El factor  $k_b/k_b'$  es un indicativo de en qué sentido está favorecida la reacción de precipitación/solubilización de la hemoglobina. Un valor superior a la unidad significa que la hemoglobina se precipita a mayor velocidad de lo que se puede resuspender y, por tanto, la cantidad de precipitado será mucho mayor, tal como ocurre con la hidrólisis mediante NaOH 9M. Un valor inferior a la unidad significa que la forma soluble estará mucho más presente, ya que no precipita tan rápido como se solubiliza; es el caso de la hidrólisis llevada a cabo con NaOH 6M. Por último, un valor cercano a la unidad, como en el experimento llevado a cabo con NaOH 3M, indica que los valores de hemoglobina precipitada y soluble permanecen prácticamente constantes.

El parámetro que viene reflejado por la expresión  $k_c/k_c'$ , indica la formación de péptidos insolubles a partir de la fracción SP y su posterior redisolución. Para las tres concentraciones de NaOH evaluadas el valor está muy próximo a la unidad, por lo que

un proceso contrarresta al otro y, a efectos prácticos, esta reacción de equilibrio tiene poca influencia en los resultados experimentales observados.

*Tabla 31. Valores de las constantes cinéticas ( $k_x$ ) obtenidas para la hidrólisis con NaOH a diferentes concentraciones, basándose en el modelo cinético propuesto. Los valores están expresados en  $h^{-1}$ .*

Constante	NaOH 9M	NaOH 6M	NaOH 3M
$k_a$	0.0135	0.0034	0.0385
$k_b$	0.1164	0.1069	0.2382
$k_{b'}$	0.0443	0.5176	0.2515
$k_c$	0.0014	0.0003	0.0070
$k_{c'}$	0.0014	0.0003	0.0070
$k_d$	-	-	-
$k_e$	-	-	-
$k_f$	0.0005	0.0001	0.0004
$k_b/k_{b'}$	2.6264	0.2066	0.9469
$k_c/k_{c'}$	1.0000	1.0000	1.0020
$R^2$	0.9200	0.9720	0.9960

En la Tabla 31 se muestra como los parámetros cinéticos  $k_d$  y  $k_e$  no reflejan ningún valor. Esto es debido a que el programa utilizado para realizar los cálculos arrojaba un valor varios órdenes de magnitud por debajo del resto de constantes cinéticas; por tanto su influencia es despreciable en el proceso total y el programa no los ha tenido en cuenta. En la Figura 35 se representa un ajuste de los datos experimentales del proceso de hidrólisis.



## Hidrólisis química básica de hemoglobina

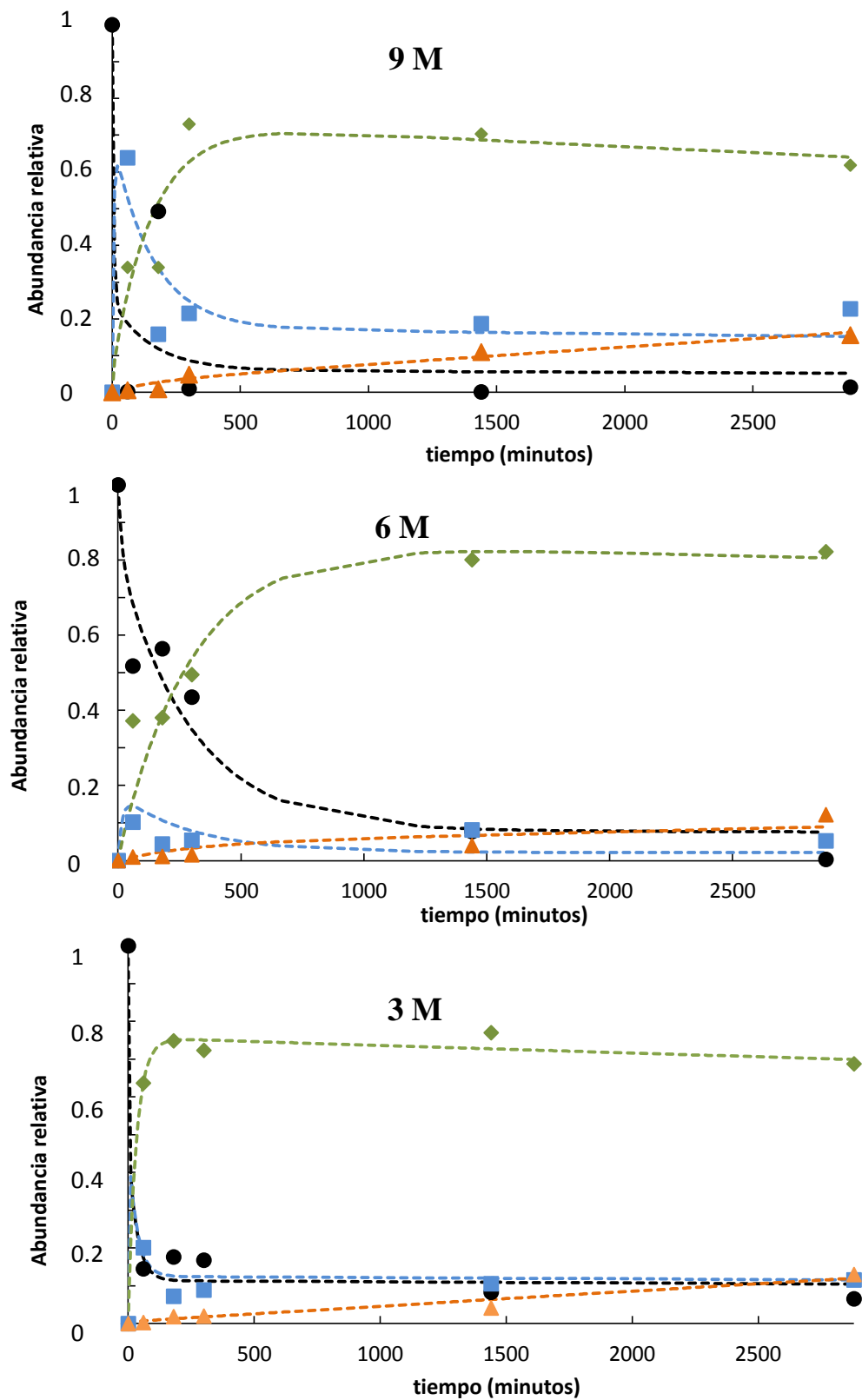


Figura 35. Comparación entre los datos experimentales y los datos predichos en la simulación de las hidrólisis básicas usando diferentes concentraciones de NaOH. Hemoglobina: ● , NSP: ■ , SP: ◆ y Aa: ▲.

#### **4.4.2 Neutralización y eliminación de sales**

Como se ha indicado anteriormente, después completar el tiempo óptimo de hidrólisis con métodos químicos, es perentorio neutralizar el ácido o la base empleado como agente hidrolizante, con la finalidad de detener el proceso de hidrólisis. Para ello, en este trabajo se propone que un proceso de hidrólisis química ácida sea realizada en paralelo con otro proceso de hidrólisis química básica. Si se crea una mezcla de los productos finales de ambas hidrólisis en las proporciones adecuadas, de tal modo que al realizarla se obtenga un medio de un pH neutro, habremos parado el proceso y neutralizado los agentes hidrolizantes sin gasto de reactivos. Con este sistema de trabajo se consigue por un lado aprovechar por completo los materiales empleados para el proceso y, por otro, subsanar los perjuicios que ambas hidrólisis producen en cuanto a degradación de aminoácidos. En la Tabla 32 se puede observar como cada uno de los procesos degrada diferentes aminoácidos y por tanto, una mezcla de los productos de hidrólisis de ambos asegura que en el medio estén presentes todos los aminoácidos que originalmente estaban en la hemoglobina. Como se ha visto, las hidrólisis llevadas a cabo con ácido sulfúrico 6M e hidróxido sódico 6M son las que mejor rendimiento ofrecen, por lo que son estos dos medios los que se han seleccionado para efectuar la hidrólisis paralela y posterior neutralización.

Tabla 32. Efecto de las hidrólisis químicas en los diferentes aminoácidos.

<b>Tipo de hidrólisis</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Efecto</b>
<b>Ácida</b>	Valina, Isoleucina	Enlaces resistentes a la hidrólisis
	Treonina, Serina	Degradados lentamente
	Metionina	Parcialmente oxidada
	Asparagina	Convertida en aspartato
	Glutamina	Convertida en glutamato
	Triptófano	Destruído
	Cistina	Destruído
<b>Básica</b>	Serina, Treonina, Arginina, Cisteina	Destruídos
	Resto de aminoácidos destruidos en la hidrólisis ácida	Conservados

El ácido sulfúrico, al ser neutralizado con hidróxido sódico forma sulfato sódico. Esta sal ha de ser eliminada del medio para finalmente obtener un producto que este compuesto exclusivamente por aminoácidos y péptidos. Para ello, se propone realizar una precipitación en frío, ya que el sulfato sódico tiene su mínimo de solubilidad cuando la disolución en la que se encuentra alcanza los 4°C. Por tanto, una vez que la neutralización se ha realizado se procede a enfriar la mezcla hasta alcanzar dicha temperatura. Después de centrifugar la mezcla en un medio frío, para evitar que se resuspenda la sal, se obtiene un precipitado formado por sulfato sódico y un sobrenadante con una muy baja concentración de la sal. En el precipitado aun se podían detectar importantes cantidades de proteína junto con la sal, por lo que se procedió a

realizar un lavado del mismo con agua fría. Para ello se le agregó agua fría hasta alcanzar el volumen inicial de la muestra y se agitó durante 10 minutos, conservando la temperatura estable, y se repitió el proceso de centrifugado para obtener un nuevo precipitado y recuperar el sobrenadante. Esta operación se repitió una tercera vez para recuperar el máximo de proteína posible.

La cantidad de proteínas recuperada tras cada una de las centrifugaciones depende de la naturaleza de dichas proteínas, tal y como reveló el análisis de los sobrenadantes en cada una de las extracciones. que dio el siguiente resultado:

- La recuperación de aminoácidos tenía lugar en más del 90 % en el primer paso de eliminación de sal. El restante 10% se recuperaba en los dos siguientes pasos.
- La fracción SP era recuperada en un 60% en el primer paso y un 25-30% en el segundo. El 10% por ciento restante era recuperado en la tercera y última operación de lavado.
- La fracción NSP era recuperada de forma idéntica en los tres pasos, siendo del orden del 30% en cada uno de ellos.

Por tanto, una vez finalizada la hidrólisis por medio ácido y básico, neutralizado el medio mediante combinación adecuada del resultado de ambas hidrólisis y eliminadas las sales sobrantes, obtenemos un medio a pH neutro rico en péptidos y en todos aquellos aminoácidos presentes inicialmente en la hemoglobina.

#### 4.5 HIDRÓLISIS EN ATMÓSFERA OXIDANTE Y REDUCTORA.

Los métodos químicos, empleados en este trabajo para producir péptidos a partir de la hemoglobina, presentan buenos resultados en cuanto a rendimiento, dado como cantidad de péptidos producidos. Los péptidos producidos son de menor tamaño que las subunidades de la hemoglobina y el proceso es sencillo de controlar. No obstante, cuando se plantea como objetivo la producción de péptidos para incluirlos en la composición de alimentos, se ha de buscar que éstos posean un tamaño menor del obtenido mediante los métodos de hidrólisis aplicados hasta este momento. Esto es debido a que a menor tamaño más se facilita la digestibilidad<sup>9, 26</sup> y se encuentran mejores propiedades funcionales y antioxidantes<sup>81, 110</sup>. Por último, desde el año 2003, en caso de ser usados para pienso de animales, la ley obliga a que los péptidos tengan un tamaño máximo de 10 kDa<sup>95</sup>.

Con el objetivo en mente de obtener péptidos de menor tamaño a partir de la hemoglobina, además de la premisa de no recurrir al empleo de enzimas hidrolíticas, se planteó la posibilidad de emplear temperaturas más altas y presiones superiores a la atmosférica durante el proceso de hidrólisis. Para ello, se empleó el sistema del reactor agitado y termostatizado que se especifica en el Capítulo 3 de esta memoria. El objetivo de estos cambios, con respecto a la técnica anterior, es mejorar la solubilidad y por tanto mejorar el rendimiento de cara a obtener péptidos de un tamaño final inferior a 10 kDa.

Después de una revisión bibliográfica se encontraron evidencias de que muy altas presiones (más de 100MPa)<sup>45, 98</sup> y temperaturas (superiores a los 200-300°C)<sup>103, 104, 138</sup> eran capaces por sí mismas de hidrolizar proteínas. Dado que en estos trabajos se perseguía la producción de aminoácidos, y que en nuestro caso el interés está enfocado hacia la obtención de péptidos de bajo peso molecular, se tomó la decisión de emplear

condiciones menos severas que las referidas en los trabajos hallados en la bibliografía. Las condiciones elegidas fueron 4 MPa y un rango de temperaturas de entre 120 a 150°C.

Pruebas preliminares realizadas en un reactor a altas temperaturas, (>120°C) y en las que la hemoglobina se trataba en un medio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M y 6M) produjeron péptidos de bajo peso molecular, pero con una alta producción de precipitados. Además, el proceso provocó un desgaste muy significativo de la parte interna del reactor y de las palas de agitación.

Durante estas pruebas preliminares se observó, además, que el gas empleado para elevar la presión del reactor hasta el valor deseado tenía una gran influencia en tres aspectos fundamentales: tamaño medio final de los péptidos obtenidos, tiempo de reacción y color de la muestra. Debido a esto se realizaron estudios de la influencia de la temperatura y del tipo de atmósfera empleada: oxígeno (oxidante) o nitrógeno (reductora) en el tamaño final de los péptidos, así como en el rendimiento de cada proceso, producción de residuos amoniacales, propiedades funcionales, propiedades antioxidantes y variación del color.

Una vez planteado el por qué se decidió emplear esta metodología, se procede a la exposición de los resultados obtenidos empleando altas temperaturas, presiones moderadas y atmósfera controlada para la producción de péptidos a partir de hemoglobina purificada.

En primer lugar y debido a la gran cantidad de datos a estudiar, se expondrán por separado los resultados obtenidos en lo referente a rendimiento y tamaño de los péptidos con cada una de las atmósferas utilizadas; finalmente se hará una comparación de las

diferentes propiedades funcionales y antioxidantes que se obtienen a partir de estos nuevos péptidos.

#### **4.5.1 Influencia de la temperatura de hidrólisis en el tamaño de los péptidos y en el rendimiento, bajo atmósfera reductora (nitrógeno)**

Como se ha mencionado en los párrafos anteriores, la temperatura es un parámetro fundamental que va a determinar de forma muy significativa el tamaño final de los péptidos producidos, así como el rendimiento del proceso. En los ensayos previos se había mostrado que las temperaturas superiores a 100°C eran las más efectivas para producir moléculas con un tamaño menor a los 10 kDa. Para conocer que temperatura era la más adecuada se procedió a realizar una comparación de los resultados de tres temperaturas diferentes: 120, 150 y 180°C.

Los péptidos analizados fueron separados en diferentes fracciones según su tamaño para facilitar su estudio: >10 kDa, 10 - 6 kDa, 6 -1 kDa y < 1 kDa. La concentración de cada una de estas fracciones, a lo largo del tiempo de hidrólisis y a diferentes temperaturas, se resume en la Tabla 33. En la Figura 36 se refleja el diferente rendimiento obtenido con las temperaturas ensayadas y el tamaño medio de los péptidos.

Tabla 33. Concentración de péptidos solubles según su tamaño, dado como porcentaje de la cantidad inicial de hemoglobina, obtenidos a diferentes temperaturas, en atmósfera de nitrógeno.

**Concentración de péptidos (% en peso)**

Temperatura(°C)		120°C					150°C					180°C				
		40	100	220	300	400	75	105	165	280	345	90	180	270	360	420
tamaño (kDa)	>10 kDa	2.8	5.0	7.4	12.2	17.6	10.4	17.0	23.8	25.8	21.4	6.4	6.8	4.2	6.2	5.6
	10 - 6 kDa	0.4	1.4	1.6	2.4	3.0	2.2	3.6	5.8	7.8	7.0	3	3.8	3.6	7.4	7.8
	6 - 1 kDa	2.0	1.8	2.0	3.2	4.0	3.2	5.2	9.0	9.0	13.6	9.2	17.2	16	26.2	29.8
	<1 kDa	0.2	2.4	2.8	4.0	4.4	3.8	5.0	7.8	11.4	8.4	10.6	18.4	21.8	38.2	40.6



4.- Resultados y Discusión  
Hidrólisis física de hemoglobina

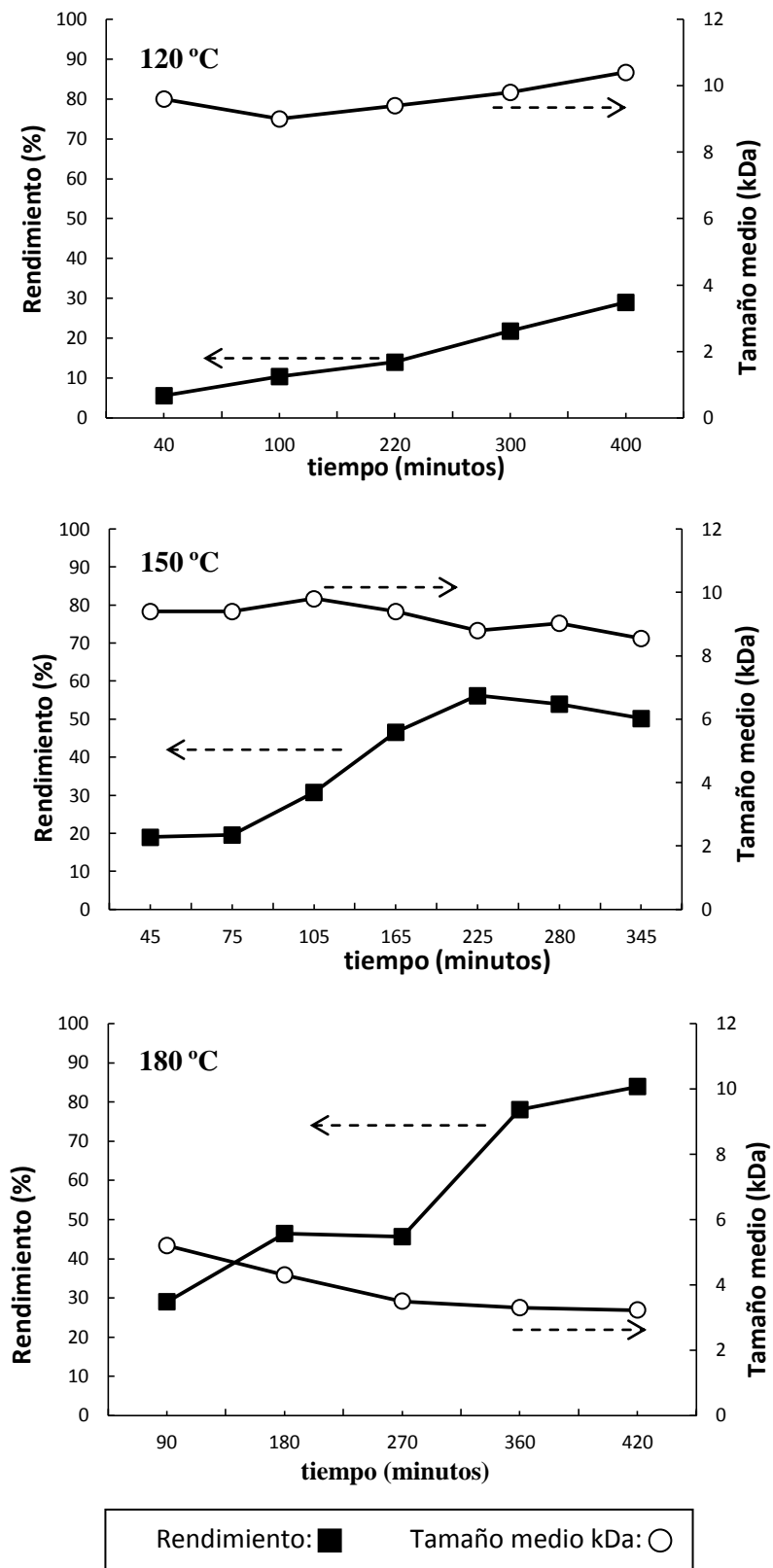


Figura 36. Rendimiento del proceso de hidrólisis y evolución del tamaño medio de los péptidos con el tiempo, cuando se trabaja con atmósfera de nitrógeno a diferentes temperaturas.

Como se puede observar a la vista de la Tabla 33 y de la Figura 36, la temperatura tiene un doble efecto en los resultados obtenidos, afectando tanto al tamaño medio final de los péptidos (que disminuye con el aumento de temperatura) como al rendimiento del proceso, dado como concentración total de péptidos solubles a cada momento (que aumenta con la temperatura).

Con respecto al rendimiento es muy destacable como a mayor temperatura más alta es la concentración de péptidos medibles a medida que transcurre el proceso. A temperaturas de 120°C tan solo 14.5 mg/mL de péptidos son detectados al final del proceso, lo que supone un rendimiento del 29% con respecto a la hemoglobina inicial empleada. Temperaturas 30°C superiores mejoran el rendimiento hasta un 50%, pero no es hasta trabajar a temperaturas de 180°C cuando se obtiene un rendimiento del 80% a un tiempo de 360 minutos y del 84% cuando se mide a 420 minutos.

A pesar de que para todas las temperaturas se han detectado péptidos de todos los tamaños, la cantidad de péptidos obtenidos de cada tamaño sí depende en gran medida de la temperatura, por lo que la temperatura va a determinar el tamaño medio final de péptidos que se obtiene. En la Figura 36 se observa como a temperaturas de 120 y 150°C los péptidos mayoritarios son los de un tamaño superior a 10 kDa, representando el 60 y el 42% del total de péptidos, respectivamente. Esto implica que a dichas temperaturas se obtenga un tamaño medio de péptido de 10.5 y 8.5 kDa. Por otro lado, a dichas temperaturas sólo un 15 % (120°C) y un 20% (150°C) del total de los péptidos tienen un tamaño inferior a 1 kDa. Por el contrario, a 180°C estos porcentajes se invierten y los péptidos de más de 10 kDa solo significan un 7% del total, mientras que prácticamente un 50% del total tienen menos de 1 kDa; por lo que el tamaño medio a 180°C se determinó en 3.5 kDa.

A temperaturas de 180°C se necesitan 270 minutos para alcanzar el tamaño medio final, aunque a este tiempo tan solo un 45% de la cantidad de hemoglobina inicial es transformada en péptidos. Un nuevo análisis realizado a 360 minutos de reacción revela que el tamaño medio sigue siendo constante, sin embargo en este caso el rendimiento se incrementa hasta un 80%. A temperaturas inferiores se observa un comportamiento similar, aunque no tan acusado, siendo el tamaño medio de péptido constante durante la mayoría del proceso; sin embargo, los péptidos solubles se van incrementando a medida que transcurre el tiempo. El rendimiento de este proceso es superior al que ha sido publicado por otros autores<sup>45, 99</sup> que empleaban condiciones subcríticas para obtener aminoácidos; en dichas publicaciones se hace referencia a un rendimiento del 60%. Cabe destacar que, además, en dichos trabajos las concentraciones iniciales empleadas eran inferiores, usándose concentraciones iniciales del 10 g/l, mientras que en el presente trabajo se emplean 50 g/l de hemoglobina.

#### **4.5.2 Influencia de la temperatura de hidrólisis en el tamaño de los péptidos y en el rendimiento, bajo atmósfera oxidante (de oxígeno)**

Cuándo se emplea oxígeno como gas para aumentar la presión dentro del reactor, los tamaños medios de los péptidos y el tiempo necesario para alcanzar un rendimiento elevado son diferentes con respecto al caso anterior, en el que se empleaba nitrógeno. Los resultados relativos a la cantidad de péptidos solubles de diferente tamaño obtenidos en relación a la cantidad de hemoglobina inicial, se ven reflejados en la Tabla 34.

Tabla 34. Concentración de péptidos solubles según su tamaño, dado como porcentaje de la cantidad inicial de hemoglobina, obtenidos a diferentes temperaturas, en atmósfera de oxígeno.

		Concentración de péptidos (%)														
Temperatura(°C)		120°C					150°C					180°C				
tiempo (min)		60	120	180	240	300	60	180	240	360	500	120	180	240	320	490
tamaño (kDa)	>10 kDa	0.8	2.0	1.6	3.8	5.7	2.7	11.5	12.9	10.6	8.3	5.6	1	1	0	0
	10 - 6 kDa	0.4	0.6	0.5	1.0	1.8	1.0	3.4	4.0	3.5	3.6	3.2	1.2	1.2	0.2	0
	6 - 1 kDa	1.4	1.8	1.5	3.4	1.6	2.7	11.0	16.0	19.9	23.2	19.6	16	17	6.8	6.8
	<1 kDa	4.3	4.1	2.9	5.7	6.8	5.0	14.3	19.8	27.8	41.0	29.8	52	61.4	29	22.4

Al igual que en el caso anterior, un incremento de la temperatura provoca que sea necesario un menor tiempo para obtener un alto rendimiento de producción de péptidos; del mismo modo, el tamaño medio de los péptidos es también menor a medida que la temperatura aumenta.

Las hidrólisis llevadas a cabo a 120°C produjeron un rendimiento final del 15%, para lo cual fueron necesarios 300 minutos de operación. Este rendimiento es muy similar al obtenido con atmósferas de nitrógeno, sin embargo, el tamaño medio final de péptidos obtenido en atmósfera de oxígeno es menor (7.6 kDa) que cuando se trabaja en atmósfera de nitrógeno (10 kDa).

Cuando la temperatura se incrementa también lo hace el rendimiento, siendo éste de 75% y del 81% cuando se trabaja a temperaturas de 150 y 180°C, respectivamente. Estos altos grados de rendimiento se alcanzan empleando tiempos más cortos que los necesarios cuando se trabaja en atmósfera de nitrógeno. A 180°C el tiempo para obtener el máximo rendimiento es reducido en un 47%, a la vez que el tamaño medio de los péptidos se ve reducido de 3.2 kDa (en nitrógeno) a 2 kDa (en oxígeno). Este factor tiene una gran influencia en las propiedades funcionales y antioxidantes de los péptidos, que fueron ensayadas a posteriori, ya que, como se mostrará más adelante, a menores tamaños medios de péptido, mejores propiedades. La diferencia más destacada entre utilizar una atmósfera u otra, es que en atmósfera de oxígeno siempre son mayoritarios los péptidos menores de 1 kDa, sea cual sea la temperatura empleada y el tiempo al que se analice la muestra. Aun así, la cantidad de péptidos de menos de 1kDa es mayor cuando la temperatura aumenta; esto se traduce en un tamaño medio mucho más pequeño. El porcentaje de estos péptidos de menor tamaño en el punto de mayor rendimiento es de 47.5%, 54% y 76% para 120, 150 y 180°C, respectivamente.

En la Figura 37 se refleja la evolución de la cantidad de péptidos solubles y el tamaño medio de los mismos a lo largo de la hidrólisis.

Como se puede observar, el tamaño medio de los péptidos se puede reducir considerablemente, hasta un tamaño medio de 1 kDa, si se trabaja a temperaturas más altas (180°C). Esta disminución del tamaño medio de los péptidos se logra a expensas de disminuir el rendimiento del proceso, que es más elevado cuando se realiza la hidrólisis a 150°C. Esta caída del rendimiento tiene lugar porque a medida que los péptidos disminuyen, se forman más compuestos de degradación que reducen la cantidad total de proteína detectada. Este efecto no se apreció en las reacciones llevadas a cabo a menores temperaturas. Debido a esto se debe elegir cuidadosamente la temperatura de trabajo y el tiempo de hidrólisis de modo que se logre alcanzar un compromiso entre el tamaño final de los péptidos y el rendimiento total del proceso.

Como ya ocurría al emplear nitrógeno como atmósfera de trabajo, cuando la hidrólisis se realizó en presencia de oxígeno el rendimiento alcanzado fue muy superior al descrito en la bibliografía para otros sistemas en los que se emplean altas presiones y temperaturas para hidrolizar proteínas<sup>99, 131</sup>.

Cabe destacar que el rendimiento obtenido en ambas atmósferas, nitrógeno y oxígeno, es muy similar, situándose cercano al 80% de conversión de hemoglobina en péptidos solubles. Este hecho concuerda con lo descrito en otros trabajos<sup>131</sup>, donde se demostraba que el rendimiento del proceso de hidrólisis era independiente de la atmósfera empleada, bien ésta fuera nitrógeno, aire o anhídrido carbónico.

4.- Resultados y Discusión  
Hidrólisis física de hemoglobina

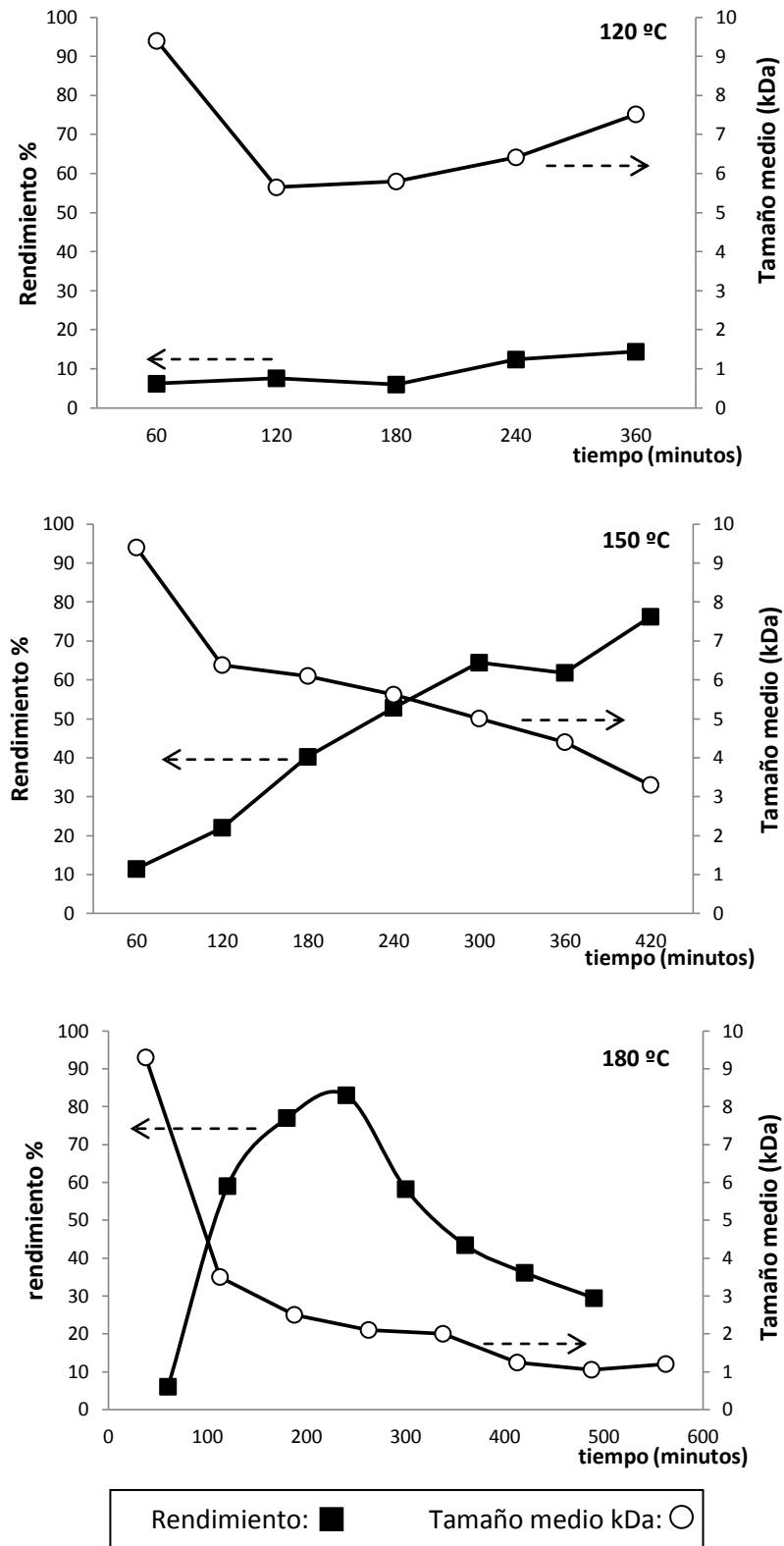


Figura 37. Rendimiento del proceso de hidrólisis y evolución del tamaño medio de los péptidos con el tiempo, cuando se trabaja con atmósfera de oxígeno a diferentes temperaturas.

### **4.5.3 Influencia de la temperatura y la presión en el proceso de hidrólisis**

En todos los experimentos realizados, independientemente de la temperatura y de la atmósfera empleada, una vez transcurridos 60 minutos desde el inicio del proceso de hidrólisis, no se pudo detectar presencia de hemoglobina. Esto es debido, a que las interacciones hidrofóbicas que mantienen la estructura cuaternaria de la proteína son las primeras en verse afectadas bajo las condiciones de presión y temperatura evaluadas, dando lugar a la aparición de las subunidades proteicas desde las primeras etapas del proceso.

El doble efecto de la temperatura sobre el rendimiento y tamaño de los péptidos, puede ser explicado teniendo en cuenta que la temperatura influye directamente en el grado de plegamiento de las proteínas. Al inicio del proceso la temperatura y la presión son incrementadas gradualmente, lo que induce un desdoblamiento de las estructuras terciarias de las proteínas, que finalmente conlleva a la formación de agregados insolubles. Estos agregados son más susceptibles de ser rotos a medida que la temperatura se incrementa y que aumenta el tiempo de hidrólisis. Así, a medida que aumenta el tiempo de hidrólisis, los agregados se rompen dando como resultado la liberación de proteínas solubles que, a continuación, se transforman en péptidos de menor tamaño. Es por esto que el rendimiento, dado como cantidad de péptidos solubles, se incrementa con el tiempo y la temperatura; a excepción de cuando se emplea una atmósfera de oxígeno y temperatura de 180°C. En este caso se observa un incremento del rendimiento, el cual decae drásticamente y de forma continuada a partir del minuto 250.

Cuando la temperatura de hidrólisis es de 150°C, si la reacción no se deja el tiempo suficiente, los agregados formados no llegan a romperse. Estos agregados



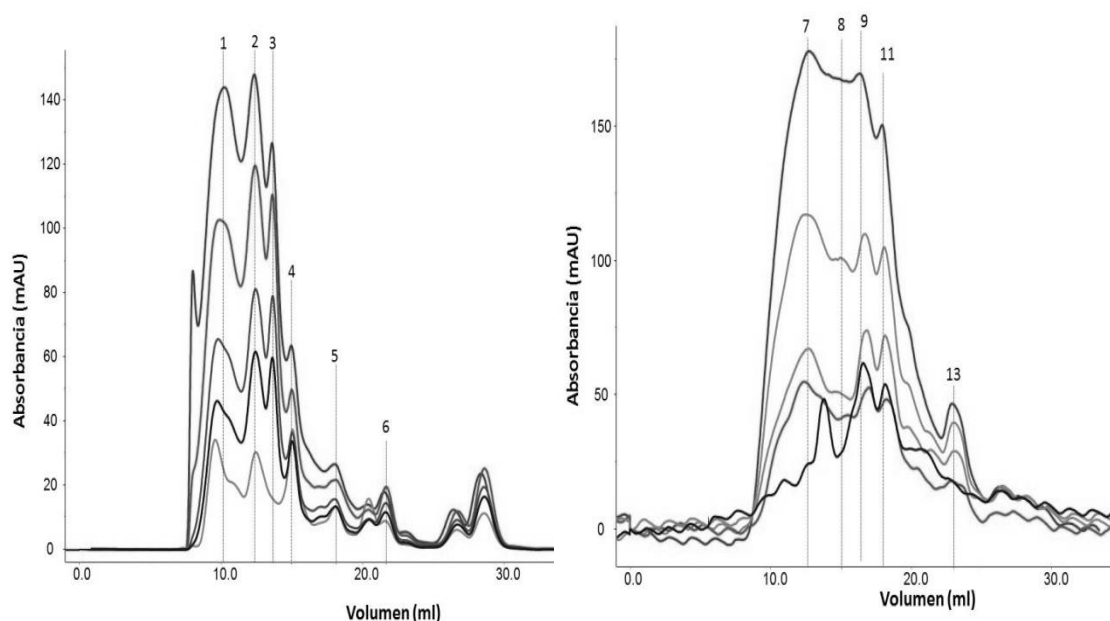
protegen los enlaces peptídicos y, por tanto, el número de enlaces afectados por la hidrólisis es menor, dando por consiguiente un mayor tamaño de los péptidos. Cuando aumenta el tiempo de hidrólisis o cuando se emplean temperaturas superiores (180°C) los agregados formados son más susceptibles de ser rotos, dando como resultado una mayor exposición de los enlaces peptídicos a la hidrólisis, que se resume en un menor tamaño final de los péptidos. En la literatura<sup>88</sup> se ha recogido como ciertos enlaces peptídicos son mucho más resistentes a la hidrólisis, sobre todo los que tienen aminoácidos hidrofóbicos implicados (especialmente valina, alanina e isoleucina) los cuales son relativamente frecuentes en la hemoglobina. Es por ello, por lo que se requieren mayores temperaturas para romper determinados enlaces peptídicos en la hemoglobina, lo que originará que se logren péptidos de menor tamaño.

El efecto combinado de la presión y la temperatura sobre el grado de desnaturalización de una proteína se refleja en el diagrama de fases de Smeller<sup>107</sup> (mostrado en el Apartado 2.9.3.3 de este trabajo), en el cual se muestra como incrementos de la presión permiten a las proteínas mantener su estructura nativa a temperaturas más altas que a presiones atmosféricas. Este hecho permite aumentar el rendimiento del proceso, ya que realizando la hidrólisis en un medio gaseoso que aumente la presión, se contrarresta el efecto de la temperatura, con lo que es posible trabajar a temperaturas elevadas sin que las proteínas se desnaturalicen e insolubilicen.

#### **4.5.4 Análisis de los perfiles cromatográficos**

Todas las muestras fueron analizadas con un equipo FPLC lo que nos permite monitorizar la distribución de tamaños de los péptidos obtenidos. Como ya se ha comentado el tamaño medio y el rendimiento son dependientes tanto de la temperatura

como del gas inyectado. Por tanto, era de esperar que los cromatogramas obtenidos fueran específicos para cada combinación temperatura/atmósfera empleada. Los cromatogramas se recogen en las Figuras 38a a 38c. Los picos más representativos han sido identificados del 1 al 6 en el caso de la hidrólisis llevada a cabo en atmósfera de nitrógeno y del 7 al 13 para la hidrólisis en atmósfera oxidante. La enumeración de dichos picos aparece indicada en las Tablas 35 y 36.



*Figura 38a. Perfiles cromatográficos obtenidos a diferentes tiempos de reacción para la hidrólisis llevada a cabo a 120°C en presencia de nitrógeno (izquierda) y oxígeno (derecha)*

#### 4.- Resultados y Discusión

##### Hidrólisis física de hemoglobina

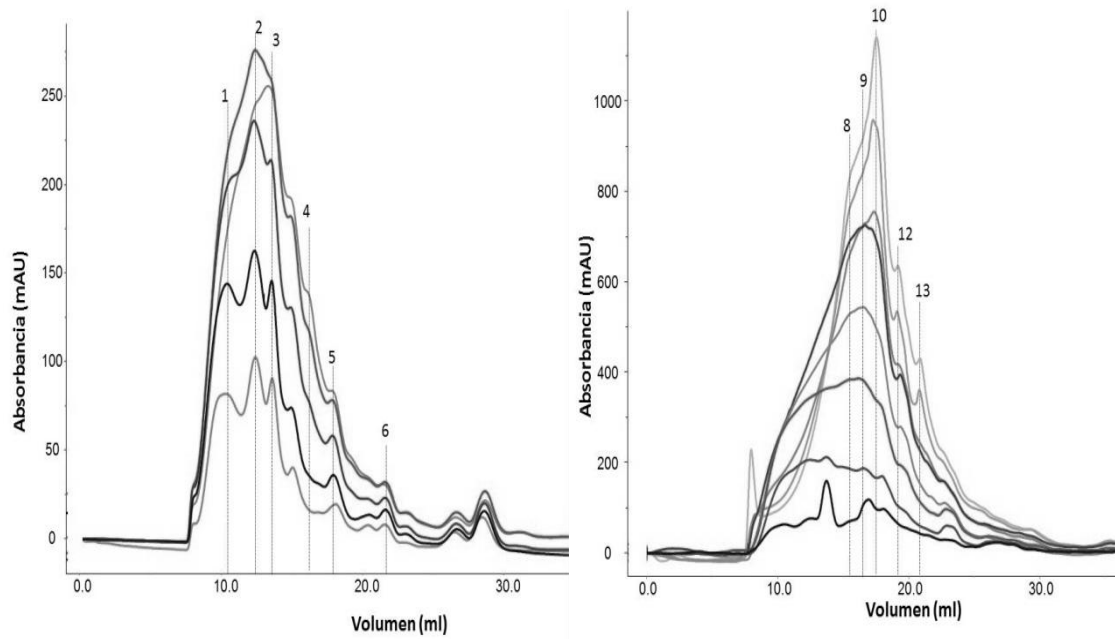


Figura 38b. Perfiles cromatográficos obtenidos a diferentes tiempos de reacción para la hidrólisis llevada a cabo a 150°C en presencia de nitrógeno (izquierda) y oxígeno (derecha).

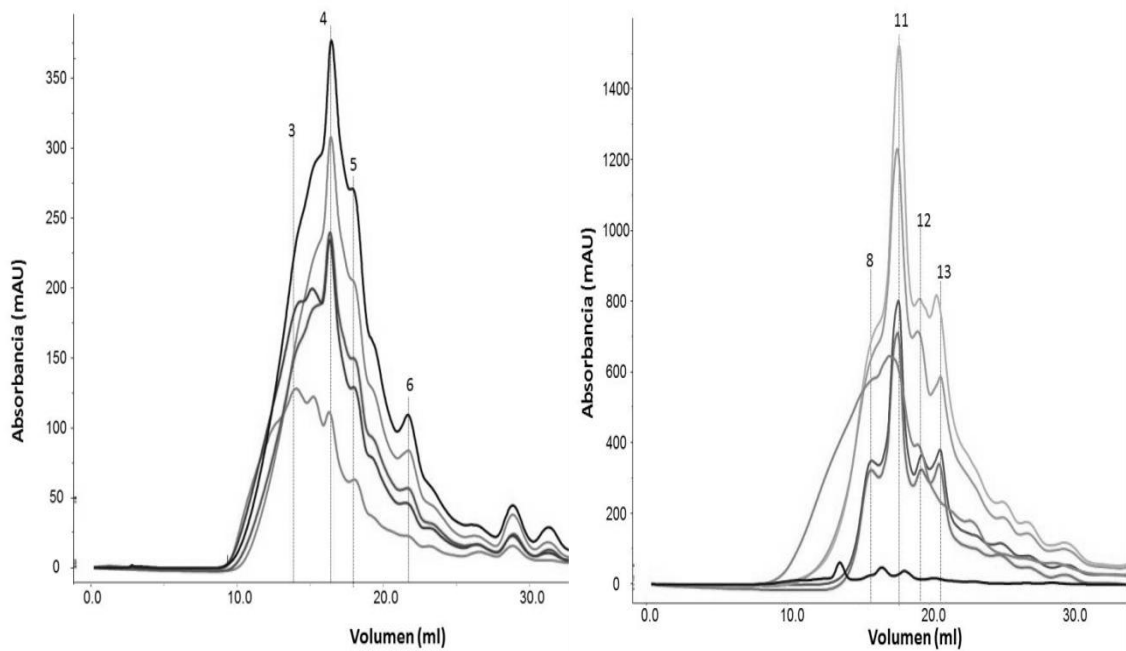


Figura 38c. Perfiles cromatográficos obtenidos a diferentes tiempos de reacción para la hidrólisis llevada a cabo a 180°C en presencia de nitrógeno (izquierda) y oxígeno (derecha).

*Tabla 35. Principales picos detectados mediante cromatografía FPLC realizada a diferentes tiempos durante la hidrólisis de la hemoglobina a diferentes temperaturas. Hidrólisis realizada en atmósfera de nitrógeno.*

Nº de pico	Tamaño (Da)	Tiempo de elución (min)		
		120°C	150°C	180°C
1	35800	10.4	10.4	-
2	12700	12.4	12.4	-
3	6200	13.6	13.6	13.5
4	1500	16.0	15.8	15.9
5	741	17.9	17.8	17.9
6	110	21.5	21.7	21.7

*Tabla 36. Principales picos detectados mediante cromatografía FPLC realizada a diferentes tiempos durante la hidrólisis de la hemoglobina a diferentes temperaturas. Hidrólisis realizada en atmósfera de oxígeno.*

Nº de pico	Tamaño (Da)	Tiempo de elución		
		120°C	150°C	180°C
7	11700	12.2	-	-
8	2300	-	15.4	15.5
9	1800	16.0	16.1	-
10	1150	-	17.0	-
11	740	18.0	-	17.8
12	500	-	19.1	19.2
13	110	21.5	21.6	21.4

En función del tiempo de hidrólisis se observan claras diferencias en la altura de cada pico, la cual se veía incrementada con el tiempo, lo que refleja un aumento de la concentración de péptidos de ese tamaño con el tiempo. Este incremento era más significativo cuando el pico se correspondía con los péptidos de menor tamaño. Es

decir, a la vista de los cromatogramas se puede indicar que: (i) independientemente de la temperatura y del tiempo de hidrólisis, siempre se producían péptidos de los mismos tamaños, (ii) éstos no se modificaban una vez llegados a un tamaño final y (iii) la abundancia de péptidos de cada tamaño concreto se veía incrementada a medida que aumentaba el tiempo de hidrólisis. Este hecho incita a pensar que pueden existir enlaces más débiles que otros o menos protegidos contra el ataque hidrolítico y que por tanto sean lugares preferenciales de ruptura.

Por otro lado, en los cromatogramas correspondientes a las hidrólisis realizadas a menores temperaturas se puede apreciar como una mayor cantidad de picos son detectados, los cuales se corresponden a péptidos con pesos moleculares más altos. Esto puede ser debido a que a 120°C los agregados que se han formado protegen a los enlaces peptídicos, de modo que una menor cantidad de estos enlaces son expuestos al medio, disminuyendo la cantidad de rupturas y permitiendo que se mantengan estables péptidos de un tamaño mayor. Tal y como se comentó anteriormente, también influye el hecho de que la hemoglobina está formada por una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos (60%), los cuales forman enlaces más resistentes a la hidrólisis<sup>88</sup>, que no llegan a romperse a bajas temperaturas dichos enlaces pierden resistencia al aumentar la temperatura, lo que desemboca en la formación de péptidos de menor tamaño.

En las tablas 35 y 36 se recogen los tiempos de elución de los principales picos detectados, así como el tamaño correspondiente a cada uno de ellos.

Los picos detectados en los péptidos obtenidos bajo una atmósfera de nitrógeno y a temperaturas de 120 y 150°C presentan unos tiempos de retención muy similares. Esto parece indicar que efectivamente se están produciendo hidrólisis en puntos concretos de la hemoglobina, ya que se producen perfiles cromatográficos muy

similares. La diferencia entre ambos ensayos radica en la proporción existente en el medio de cada uno de los rangos de tamaño de péptidos analizados que, como ya se indicó, son más abundantes a 150°C, especialmente en el caso de los péptidos de bajo peso molecular.

A 180°C los picos correspondientes a péptidos con pesos moleculares mayores de 6 kDa desaparecen, lo que indica que ha tenido lugar una hidrólisis más efectiva, a consecuencia de la cual se obtiene un tamaño medio de péptido inferior.

Al analizar los tiempos de retención cuando se emplea oxígeno como gas de reacción podemos observar como el perfil cromatográfico ha variado respecto a cuándo se empleaba nitrógeno, obteniéndose siempre en este caso péptidos de menor tamaño que cuando se empleó nitrógeno. Los principales picos detectados corresponden a pesos moleculares inferiores, y aparecen además nuevos picos correspondientes a péptidos de más de 2.3 kDa, a excepción del primer pico que aparece en los análisis de hidrolizados obtenidos a 120°C, dónde se detectan péptidos de 12 kDa.

Por otro lado, en los cromatogramas siempre se detecta un pico de elución a los 21.5 mL, que corresponde con un tamaño de 100-200 Da y que probablemente se correspondan a aminoácidos liberados durante la hidrólisis.

En ambos casos, los picos detectados son constantes a lo largo del proceso de la hidrólisis, manteniendo constante el volumen de elución al que aparecen. Esto indica claramente que hay ciertos enlaces peptídicos que no se rompen. Por tanto, los péptidos de un determinado peso molecular (formados por aminoácidos que evitan que sus enlaces peptídicos internos sean hidrolizados) se acumulan a lo largo del tiempo. De ser así, estaríamos ante un proceso hidrolítico con cierta especificidad a la hora de cortar las proteínas en determinadas dianas. Dianas que tendrían la característica de estar

formadas por aminoácidos hidrofílicos y cuya posición espacial permitiera el ataque de la molécula de agua durante el proceso hidrolítico. Es decir, el número de lugares de corte preferenciales es invariable, no así la disponibilidad estérica de los mismos, lo que propicia los diferentes perfiles cromatográficos observados. Este mismo fenómeno explica por qué a mayores temperaturas (mayor desnaturalización de la hemoglobina) se obtienen péptidos más pequeños.

La importancia de este avance radica en el hecho de que controlando variables sencillas de operación (como la temperatura, presión y la naturaleza del gas inyectado) se puede controlar el tamaño final de los péptidos obtenidos. De este modo, la hidrólisis física se presenta como una técnica competitiva con respecto a la hidrólisis enzimática, que hasta el momento era la única considerada como viable de cara a controlar el tamaño final de los péptidos obtenidos. En cualquier caso, este trabajo es un primer acercamiento a este hecho, siendo necesaria la realización de estudios en mayor profundidad, relacionados con la purificación y secuenciación de estos péptidos, para poder validar esta teoría. Así mismo, es necesario detectar en qué puntos la hemoglobina es más sensible al proceso de hidrólisis física.

#### **4.5.5 Cuantificación de aminoácidos y compuestos de amonio**

Debido al proceso de hidrólisis, cierta cantidad de aminoácidos se puede detectar. Éstos pueden ser considerados como subproductos que reducen al rendimiento del proceso de producción de péptidos, ya que no son el objetivo final, o también como un valor añadido ya que su capacidad de absorción es mayor que el de los péptidos y proteínas.

Por otro lado, durante la hidrólisis se producen otra serie de subproductos que no son de utilidad y que se pueden catalogar como desechos. Este es el caso del amoníaco y sus derivados, originado por las condiciones reinantes en el reactor, siendo uno de los subproductos de hidrólisis más abundantes. Sin embargo no es el único subproducto que se puede detectar, siendo habituales amidas, aldehídos, hidrógeno, dióxido de carbono, monóxido de carbono o alcoholes<sup>125</sup>, por mencionar algunos.

En las Tablas 37 y 38, se muestra la cantidad de aminoácidos y de compuestos amoniacales que se generan con el tiempo, durante el proceso de hidrólisis a diferentes temperaturas en atmósfera de nitrógeno y oxígeno, respectivamente.

*Tabla 37. Cantidad total de aminoácidos (Aa) y de compuestos de amoníaco (CA) detectados durante la hidrólisis, dentro del reactor y en el borboteador, a diferentes temperaturas con atmósfera de nitrógeno. Cantidades expresadas en mg.*

120°C			150°C			180°C		
Minutos	Aa	CA	Minutos	Aa	CA	Minutos	Aa	CA
<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0
<b>40</b>	135	0.50	<b>45</b>	136	0.58	<b>60</b>	741	0.93
<b>100</b>	188	0.87	<b>105</b>	189	1.02	<b>90</b>	959	1.19
<b>220</b>	272	1.17	<b>165</b>	226	1.37	<b>180</b>	1031	1.54
<b>300</b>	303	1.37	<b>225</b>	310	1.61	<b>270</b>	1548	3.49
<b>400</b>	319	2,27	<b>285</b>	300	2,64	<b>360</b>	1515	4,07
<b>460</b>	318	5,38	<b>360</b>	290	6,38	<b>420</b>	1508	7,85



*Tabla 38. Cantidad total de aminoácidos (Aa) y de compuestos de amoniaco (CA) detectados durante la hidrólisis, dentro del reactor y en el borboteador, a diferentes temperaturas con atmósfera de oxígeno. Cantidades expresadas en mg.*

120°C			150°C			180°C		
Minutos	Aa	CA	Minutos	Aa	CA	Minutos	Aa	CA
<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	204	0
<b>60</b>	17	7.88	<b>60</b>	68.10	0.76	<b>60</b>	140	0.21
<b>120</b>	18	22.47	<b>120</b>	71.30	13.39	<b>120</b>	141	2.82
<b>180</b>	18	35.86	<b>240</b>	116.31	36.68	<b>240</b>	138	9.38
<b>240</b>	19	44.36	<b>300</b>	118.55	121.10	<b>300</b>	135	75.10
<b>300</b>	19	49.02	<b>360</b>	114.78	151.37	<b>360</b>	137	154.68
<b>360</b>	22	56.12	<b>420</b>	119.01	197.94	<b>420</b>	140	265.01

Como era de esperar, cuanto mayor es la temperatura empleada mayores cantidades de aminoácidos y compuestos amoniacales son detectados. Cuando la hidrólisis tiene lugar empleando nitrógeno, la cantidad de aminoácidos detectada a tiempo final a 120, 150 y 180°C supuso un 1.6, 1.8 y un 7.5% de la cantidad de proteína inicial, respectivamente. Si estas cantidades las referimos a la cantidad de péptidos recuperados los aminoácidos representan un 2.1% (120°C), 1.1% (150°C) y 3.6% (180°C) del total. Por otro lado, cuando la hidrólisis se realizó en presencia de oxígeno, la cantidad de aminoácidos detectados a tiempo final con respecto a la cantidad inicial de hemoglobina fue de 0.1% (120°C), 0.6 % (150°C) y 0.7% (180°C), y de 0.7 % (120°C), 0.7 % (150°C) y 2.3% (180°C), si la referimos a la cantidad de péptidos recuperados. Estos valores parecen reflejar que inyectar nitrógeno es más efectivo a la hora de producir aminoácidos a partir de hemoglobina, ya que se consigue una mayor de proporción de estos compuestos al final del proceso.

Se puede apreciar, en las Tablas 38 y 39, cómo una vez alcanzada una concentración límite de aminoácidos, esta se mantiene constante a lo largo del tiempo. Esto indica que la velocidad de producción de aminoácidos, a partir de este punto, se iguala con la de transformación en otros productos de desecho, tales como amoníaco.

Las cantidades de compuestos amoniacales encontradas no explican por sí mismas la estabilización en la concentración de aminoácidos. Parece claro pues, que llegado a este punto del proceso los aminoácidos formados son degradados a diferentes compuestos no evaluados, y que además, esta velocidad de degradación es igual que la de formación de aminoácidos a partir de los péptidos.

Se puede observar que la cantidad de CA producida, que procede directamente de los aminoácidos, es mayor cuando la hidrólisis se realiza empleando oxígeno. De hecho, en presencia de oxígeno se han detectado cantidades de CA entre 10 y 30 veces superiores a las halladas en atmósfera de nitrógeno. Esto explica porque la cantidad de aminoácidos detectados en presencia de oxígeno es menor, ya que lo que ocurre en realidad es que hay una mayor conversión de éstos en amoníaco y sus derivados.

Dado que el nitrógeno amoniacal es retenido en el borboteador, se ha valorado la cantidad allí retenida para determinar cómo ciertos productos residuales se forman durante el proceso. Para las diferentes temperaturas ensayadas, tan solo un 0.01% de la cantidad inicial de proteína es transformada en este tipo de compuestos en el caso de inyectar nitrógeno, mientras que hasta un 1.35% de proteínas se transforma en compuestos nitrogenados en el caso de inyectar oxígeno.

Por otro lado, cabe señalar como en atmósfera de nitrógeno, el realizar la hidrólisis a una u otra temperatura no parece influir en la producción final de compuestos amoniacales, siendo las concentraciones finales alcanzadas bastante

similares en los tres casos estudiados. Sin embargo, cuando el oxígeno está presente en la reacción, se observa una clara influencia de la temperatura sobre la cantidad de CA producidos, de hecho parece haber una relación lineal entre la cantidad de nitrógeno amoniacal final y la temperatura de hidrólisis.

El hecho de que la cantidad de CA aumente progresivamente con el tiempo, lo que implica una continua degradación de aminoácidos, implica que tiempos excesivamente prolongados de hidrólisis conducirán a un descenso del rendimiento, debido a la continua acumulación de productos de degradación, en detrimento de la cantidad de péptidos producidos.

#### **4.5.6 Propiedades funcionales.**

Siguiendo la metodología mencionada en la sección 3.7.2 de esta memoria, se procedió a evaluar la solubilidad, las propiedades gelificantes y emulsificantes de los péptidos obtenidos a diferentes atmósferas. Se han seleccionado los péptidos producidos a 180°C por ser los que mejor rendimiento tenían y para la cual el tamaño medio de los péptidos es menor. A continuación estos valores fueron comparados con los de la hemoglobina nativa que fueron mostrados en la primera sección de los resultados (apartado 4.1).

En las Figuras 39 y 40 se reflejan los datos obtenidos para la solubilidad y la capacidad emulsionante de los péptidos obtenidos. Es necesario destacar que la solubilidad es una de las propiedades funcionales más importantes, ya que de ella dependen muchas otras. Es decir, de que los péptidos y proteínas a ensayar sean solubles, va a depender el que el resto de propiedades funcionales de los péptidos sean adecuadas.

4.- Resultados y Discusión  
Hidrólisis física de hemoglobina

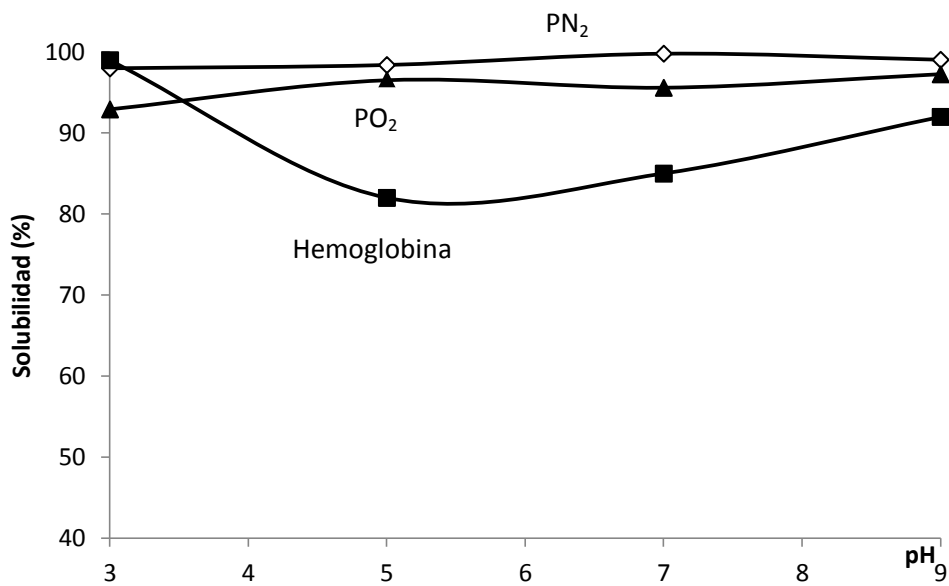


Figura 39. Solubilidad de la hemoglobina nativa, de los péptidos obtenidos con atmósfera de nitrógeno (PN<sub>2</sub>) y de oxígeno (PO<sub>2</sub>) en función del pH.

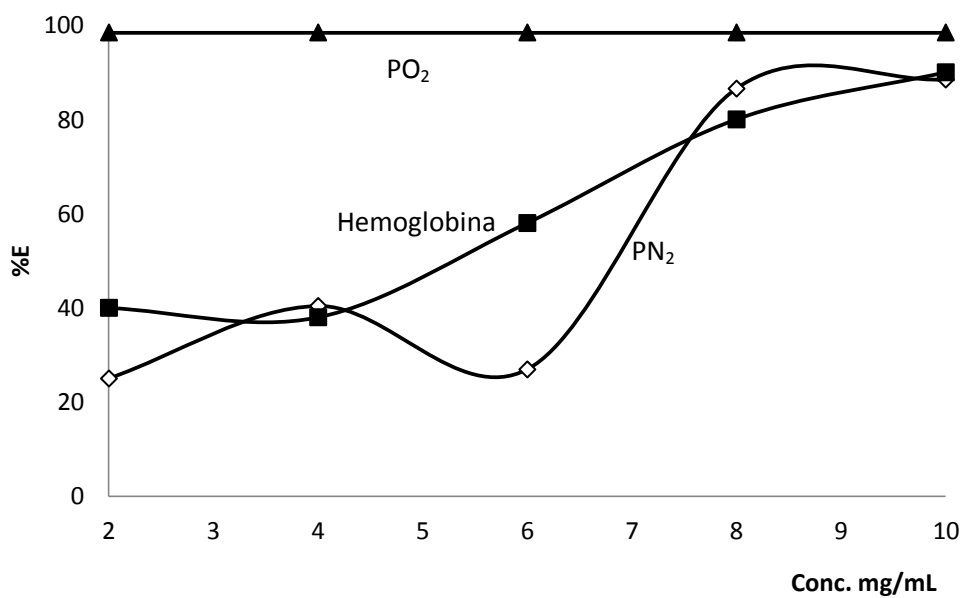


Figura 40. Capacidad de emulsificación de la hemoglobina nativa, de los péptidos obtenidos con nitrógeno (PN<sub>2</sub>) y con oxígeno (PO<sub>2</sub>) en función de la concentración de proteína.

En la Figura 39 se aprecia como la solubilidad es mayor para los péptidos hidrolizados que para la hemoglobina nativa en todos el rango de pH ensayado, excepto a pH=3 para el que la hemoglobina nativa ya presentaba una solubilidad elevada. Los péptidos producidos por la hidrólisis son mucho mas polares que la hemoglobina y sus subunidades, por tanto pueden formar puentes de hidrógeno con el agua de la disolución y resultar ligeramente más solubles en disolución acuosa. Este incremento de la solubilidad hasta valores por encima del 95% habilita el uso de la hemoglobina hidrolizada en múltiples productos alimentarios. Este hecho ya habia sido observado anteriormente en hidrolizados enzimáticos<sup>114</sup>, para los que la solubilidad se situaba entre el 93 y el 98% a medida que el pH aumentaba.

La capacidad emulsificante tiene un comportamiento muy similar en la hemoglobina nativa y con los péptidos producidos con corriente de nitrógeno, tal como se aprecia en la Figura 40. Sin embargo, los péptidos producidos en un ambiente rico en oxígeno mostraron una muy buena capacidad emulsionante, llegando casi al 100% en todo el rango de concentraciones ensayados, lo que representa una notable ventaja con respecto a la hemoglobina nativa.

La capacidad de los péptidos para formar una emulsión implica un cierto carácter anfipático de los mismos, cualidad indispensable para que las emulsiones se formen. Sin duda, el hecho de que la hemoglobina esté formada casi en un 60% por aminoácidos hidrofóbicos facilita la formación de las emulsiones. Por otro lado, el aspecto de las emulsiones con hemoglobina nativa presentan una textura firme, mientras que las obtenidas con los péptidos presenta un aspecto menos consistente. Una vez la emulsión era formada, se procedió a medir el tamaño de gota que se formaba tanto en la fase acuosa como en la fase oleosa. Estas medidas dieron como resultado que la

hemoglobina nativa tan solo formaba emulsiones tipo o/w (aceite en agua); mientras que ambos tipos de péptidos eran capaces de formar emulsiones de los dos tipos o/w y w/o, aunque la fase discontinua en ambas emulsiones era muy poco abundante. Los tamaños de gota medidos para las emulsiones hechas con péptidos fueron los siguientes:

- Hidrólisis con nitrógeno: de 3,2 a 5,9  $\mu\text{m}$  y de 0,6 a 3,7  $\mu\text{m}$  en las emulsiones tipo w/o and o/w respectivamente.
- Hidrólisis con oxígeno: 4,8  $\mu\text{m}$  para las emulsiones tipo w/o y 2,7  $\mu\text{m}$  para las del tipo o/w.

El valor HLB (balance hidrofílico-lipofílico) de un compuesto determina qué tipo de emulsiones se van a formar. Si el agente emulsionante tiene un valor HBL de entre 7 y 11 produce emulsiones tipo w/o, si su valor se sitúa entre 12 y 16 las emulsiones pasan a ser del tipo o/w. Este valor depende de las propiedades físico-químicas del compuesto emulsionante. Durante la hidrólisis, los péptidos son producidos en una gran variedad de tamaños y con secuencias de aminoácidos muy diferentes, por tanto sus propiedades físico-químicas van a diferir entre ellos. Por ello, es probable que en la mezcla de péptidos, con secuencias y tamaños muy diferentes, los haya que posean un valor HLB tal que sea posible que se formen los dos tipos de emulsiones, como se ha podido comprobar.

Finalmente, se trató de determinar la capacidad de gelificación de los péptidos obtenidos; sin embargo, no fue posible ya que los péptidos fueron incapaces de producir geles en el rango comprendido entre 2 y 20 % peso/volumen. Esto se debe a que el pequeño tamaño de los péptidos impide la interacción proteína/proteína, con lo

que no se produce una precipitación y posterior agregación y, por tanto, la gelificación no es viable. Esta característica de los péptidos, junto con su alta solubilidad, puede ser un factor interesante para aquellos productos que requieran un aporte de proteínas que sean capaces de resistir un tratamiento térmico manteniendo una textura fluida y no siendo necesaria la formación de gel, como las bebidas energéticas.

#### **4.5.7 Eficacia de decoloración de la hidrólisis física**

Uno de los mayores problemas que la hemoglobina y sus derivados presentan para su aplicación en alimentación es su gran capacidad de colorear la mezcla a la que se agregan, aunque sea en muy pequeña proporción. Este color oscuro, entre marrón y rojizo puede no ser deseable para según qué productos, de ahí el interés en desarrollar un proceso que consiga una hemoglobina que no varíe el color original de los alimentos de cara a ampliar su rango de aplicaciones. Hasta ahora, era práctica habitual emplear agua oxigenada como decolorante de la hemoglobina, ya que oxidaba el  $Fe^{2+}$  (que es el que da color rojo a la hemoglobina) a  $Fe^{3+}$ ; posteriormente, la mezcla debía ser neutralizada con catalasa de grado alimentario. Por otro lado, existen también métodos enzimáticos para romper la unión del grupo hemo y posteriormente separarlo.

En cualquier caso, el proceso de decoloración de la hemoglobina era laborioso o complicado. Con la técnica empleada en esta investigación, durante el mismo proceso de hidrólisis en que los péptidos son producidos, se produce la decoloración de los mismos. Es decir, estamos logrando dos objetivos a un tiempo, optimizando así el proceso, sin necesidad de post-tratamientos ni costes adicionales.

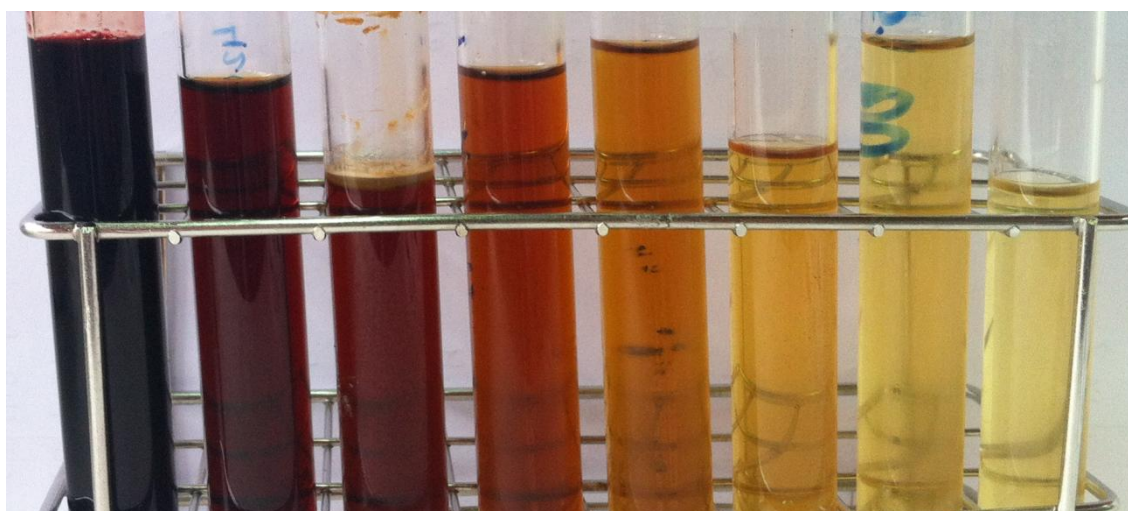
Mediante inspección visual se hace evidente la variación de color, que pasa del rojo oscuro de la hemoglobina nativa al marrón claro para los péptidos obtenidos en

atmósfera de nitrógeno y al amarillo brillante para los obtenidos en atmósfera de oxígeno. En la Figura 41 se muestra la evolución del color de una disolución de hemoglobina durante la hidrólisis con inyección de oxígeno. Para cuantificar el grado de pérdida de color de la hemoglobina durante la hidrólisis se procedió tal como ha sido indicado en la sección de metodología (Apartado 3.7.2.7) sometiendo disoluciones de hemoglobina nativa y de los péptidos a una técnica espectrofotométrica para evaluar la intensidad del color.

La medida dio como resultado una absorbancia de 0.593 UA para una disolución de hemoglobina nativa. Cuando se procedió a realizar la misma medida en los péptidos los valores de absorbancia obtenidos fueron los siguientes: 0.115 UA para los péptidos obtenidos empleando atmósfera de nitrógeno y de 0.031 UA para los obtenidos con oxígeno. Esto significa una reducción del color, con respecto al de la hemoglobina nativa, del 80% en el primer caso y del 95% en el segundo. Parece claro, por tanto, el papel desempeñado por el oxígeno, el cual oxida por completo el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en la disolución. Por su parte el nitrógeno, al ser un gas menos oxidante, no puede oxidar en igual medida al  $\text{Fe}^{3+}$  de los péptidos, por lo que el grado de decoloración es menor.

Estos resultados mejoran considerablemente los hallados en la bibliografía para otros trabajos<sup>117</sup> en los que se emplea hidrólisis enzimática combinada con altas presiones para decolorar la hemoglobina. En dichos trabajos, el valor más bajo de absorbancia alcanzado fue de 0.220 UA.





*Figura 41. Evolución del color de una disolución de hemoglobina (50 mg/mL) durante la hidrólisis con atmósfera de oxígeno. Los tiempos de hidrólisis a los que se obtuvieron son de izquierda a derecha: 0, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos.*

#### **4.5.8 Neutralización del radical hidroxilo.**

La importancia de capturar y por tanto de neutralizar los radicales hidroxilo radica en que son uno de los radicales responsables del envejecimiento celular más reactivos, por lo que pueden originar grandes daños en las células al alterar las biomoléculas con las que entran en contacto. Por ello, la capacidad de neutralizar el radical hidroxilo por parte de la hemoglobina nativa y de los péptidos productos de la hidrólisis fue evaluada. En la Figura 42 se muestran los valores obtenidos. Así mismo, con fines comparativos, se indican los valores obtenidos para el ácido ascórbico (Vitamina C), por ser este un patrón adecuado y reconocido por su capacidad de capturar radicales hidroxilo.

Tal y como se observa en la Figura 42, los péptidos presentan un efecto de captura del radical hidroxilo superior al del control empleado, el ácido ascórbico, en todo el rango de concentraciones empleado. Sin embargo, es la hemoglobina en estado nativa el compuesto de todos los ensayos que presenta un mayor efecto de captura,

superior al conseguido por los péptidos. Se puede apreciar también que el efecto de captura es independiente de la concentración de proteína, salvo en los péptidos producidos con atmósfera de oxígeno, para los que el efecto de captura mejora a medida que aumenta la concentración de péptido empleada. Por tanto, a bajas concentraciones son más efectivos, de cara a la captura de radicales hidroxilo, los péptidos producidos con nitrógeno, mientras que a partir de concentraciones de 5 mg/mL son los péptidos obtenidos por hidrólisis en oxígeno los más efectivos.

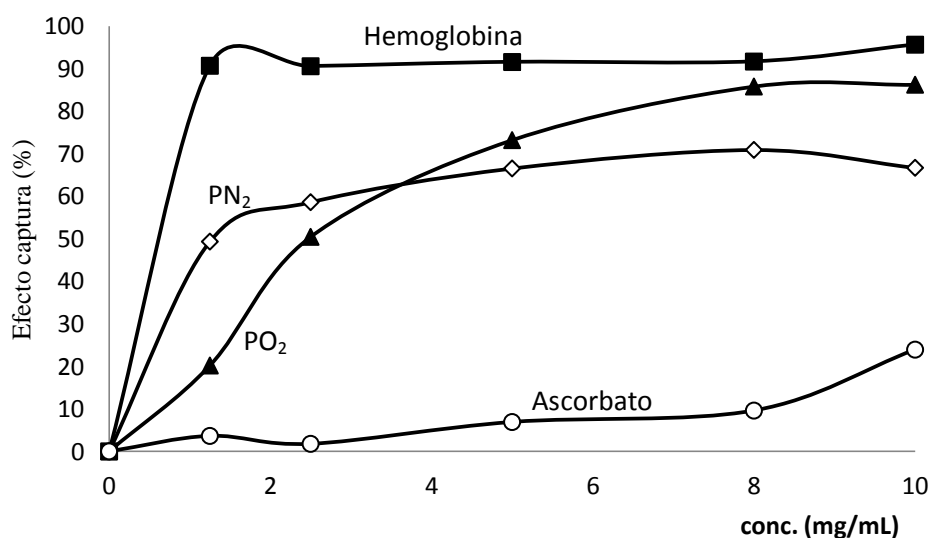


Figura 42. Efecto captura del radical hidroxilo por hemoglobina nativa, ácido ascórbico y por péptidos obtenidos en atmósfera de nitrógeno y oxígeno.

Los datos aquí mostrados, están en el mismo rango de eficacia que los mostrados por péptidos obtenidos por medio de hidrólisis enzimática, cuyos resultados eran: del 60 al 70%<sup>61</sup>; del 40 al 50%<sup>112</sup> y entre un 70 y un 80%<sup>132</sup>; y mejores que el plasma completo modificado por conjugación, que oscilaban entre un 2 y un 50%<sup>12</sup>. Algunos autores<sup>81, 110, 112</sup> han publicado que los péptidos con un peso molecular inferior a 1 kDa son los

que presentan mejores capacidades antioxidantes. Como se indicó anteriormente en esta memoria, los péptidos ensayados están formados por un 50% y un 75% de péptidos con un tamaño igual o inferior a 1 kDa, lo que les confiere estas buenas propiedades antioxidantes.

#### **4.5.9 Poder reductor**

El poder reductor (o habilidad para donar electrones) de los péptidos obtenidos fue evaluado tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos (Apartado 3.7.6.1), mediante espectrofotometría. Se evaluó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 700 nm, ya que un incremento de la absorbancia a esta longitud de onda se relaciona con un aumento del poder reductor. La evolución de la absorbancia fue seguida en el tiempo, así se pudo comprobar que los péptidos eran capaces de seguir donando electrones una vez transcurridos 70 minutos, ya que la absorbancia se vio incrementada con el tiempo en todos los rangos de concentraciones. Sin embargo, cuando el estudio se realizó con la hemoglobina nativa, se pudo comprobar que con el paso del tiempo su capacidad de donar electrones disminuía, ya que la absorbancia se veía reducida. Estos datos se reflejan en la Figura 43.

En este ensayo, los valores más altos de absorción (y por tanto de capacidad reductora) fueron arrojados por los péptidos producidos en atmósfera de nitrógeno, para todas las concentraciones y desde los primeros minutos del análisis. Así mismo, se puede observar una relación lineal entre el poder reductor y la concentración de péptido empleada, por lo que mayores dosis de los mismos producen un efecto protector contra el estrés oxidativo mucho más notable.

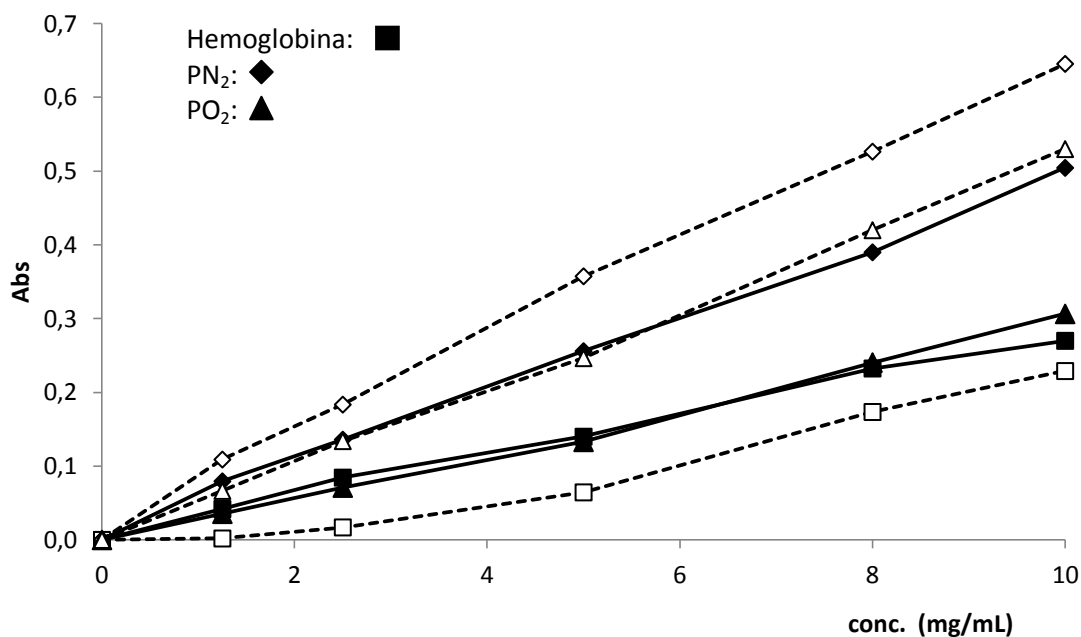


Figura 43. Poder reductor de la hemoglobina nativa y de los péptidos obtenidos con atmósfera de nitrógeno y oxígeno, en función de su concentración. Los símbolos sólidos corresponden a la absorbancia medida a los 15 minutos de incubación, los símbolos vacíos con la medida realizada a los 75 minutos.

En la bibliografía<sup>22, 74, 112</sup> se recoge como los hidrolizados de hemoglobina, producidos por otros métodos, presentaban un poder reductor muy inferior a la hemoglobina, justo al contrario de lo que ocurre con los péptidos obtenidos mediante los métodos de hidrólisis presentados en este trabajo. Por otro lado, medidas del poder reductor en plasma completo conjugado con mono y disacáridos<sup>12</sup> dieron como resultado un poder reductor muy similar al mostrado por los péptidos aquí ensayados. Esto nos hace concluir que los péptidos producidos mediante la hidrólisis física aquí planteada poseen una notable cualidad como antioxidantes.

#### 4.5.10 Capacidad de quelar el ion ferroso

Se ha demostrado que los iones de metales de transición están involucrados en muchas reacciones de oxidación “in vivo”. Los iones ferrosos pueden catalizar las

reacciones de Haber-Weiss, la cual genera radicales hidroxilo. Estos radicales después reaccionan con biomoléculas adyacentes pudiendo originar un daño severo. Así pues, compuestos capaces de neutralizar iones metálicos evitan la producción de radicales hidroxilo. Por tanto, esta capacidad quelante, junto con las dos propiedades previamente analizadas (poder reductor y neutralización de radicales hidroxilo), son esenciales para la lucha contra el estrés oxidativo.

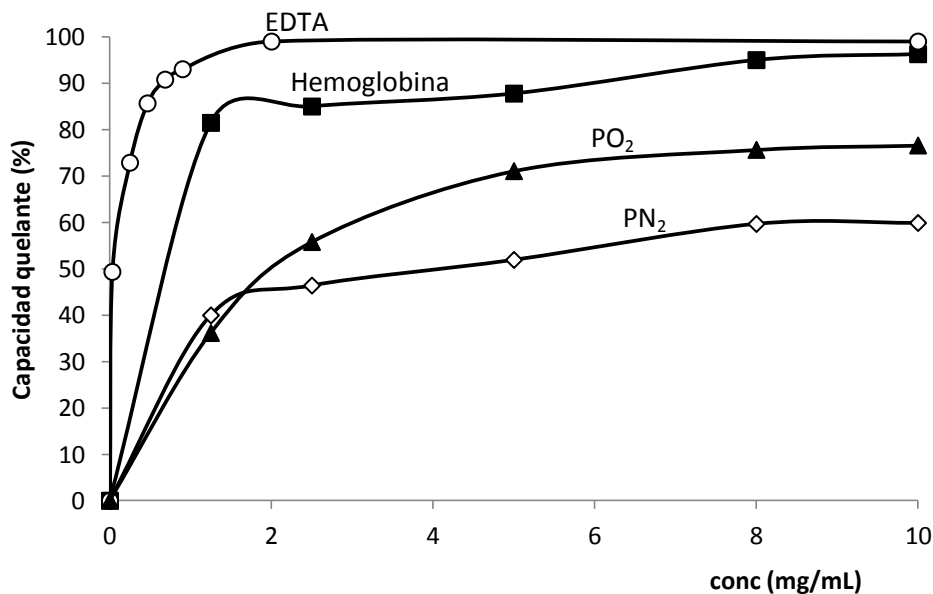


Figura 44. Capacidad quelante del ion ferroso por parte de la hemoglobina nativa y de los péptidos obtenidos bajo atmósfera de nitrógeno y oxígeno, según su concentración. Con fines comparativos, se incluye también la capacidad quelante del EDTA..

La Figura 44 refleja la capacidad quelante de los péptidos estudiados, de la hemoglobina nativa y de un control, en este caso el EDTA. Como era de esperar, el EDTA es el que presenta las mejores capacidades quelantes, siendo capaz de capturar a muy bajas concentraciones (2 mg/mL) el 100% de los iones  $Fe^{2+}$  presentes en el medio.

Por su parte, los péptidos son capaces de capturar del 45 al 60% y del 55 al 75% de iones  $\text{Fe}^{2+}$ , según sean producidos en nitrógeno o en oxígeno, dependiendo de la concentración. En el caso de la hemoglobina, ésta es capaz de capturar hasta un 90% de iones  $\text{Fe}^{2+}$  cuando se emplean concentraciones de 10 mg/mL. Tanto en el caso de los péptidos como de la hemoglobina, se observa un efecto de saturación de la capacidad quelante, es decir, una vez alcanzado un valor máximo de capacidad quelante, en torno a 5 mg/mL de proteína, éste se mantiene constante independientemente de que se siga aumentando la concentración de proteína.

#### 4.5.11 Diferencias entre los péptidos obtenidos bajo diferentes atmósferas

En la Tabla 39 se muestran, a modo de resumen las diferentes propiedades observadas tanto para la hemoglobina nativa como para los péptidos obtenidos mediante hidrólisis en atmósfera de nitrógeno y en atmósfera de oxígeno. Esta tabla nos permitirá evaluar que proteína presenta unas propiedades más adecuadas a la hora de aplicarla para un uso concreto.

*Tabla 39. Valores de tamaño medio molecular, propiedades funcionales y propiedades antioxidantes de los péptidos según su modo de producción.*

	Tamaño medio (kDa)	Rendimiento(%) (tiempo) <sup>1</sup>	Decoloración (UA)	Solubilidad <sup>2</sup> (%)	Emulsificante <sup>3</sup> (%)	Poder quelante <sup>4</sup> (%)	Captura hidroxilos <sup>4</sup> (%)	Poder reductor <sup>4</sup> (UA)
<b>PO<sub>2</sub></b>	1.1	81%(240)	0.031	100	100	71	73	0.342
<b>PN<sub>2</sub></b>	3.2	83%(420)	0.115	99	86	52	66	0.358
<b>Hb</b>	66	-	0.593	85	80	87	91	0.140

<sup>1</sup> tiempo para alcanzar ese rendimiento en minutos; <sup>2</sup> a pH 7

<sup>3</sup> a 8 mg/mL; <sup>4</sup> a 5 mg/mL.

En primer lugar, cabe destacar que el tamaño medio de péptido obtenido al final del proceso es mucho menor cuando se inyecta oxígeno en el reactor. Así, en atmósfera de oxígeno se obtienen péptidos de un tamaño medio de 1.1 kDa, mientras que bajo atmósfera de nitrógeno este tamaño casi se triplica, llegando a ser de 3.2 kDa. En adición, realizar la hidrólisis en presencia de oxígeno presenta la ventaja de que se requiere un tiempo mucho menor para llegar a rendimientos similares a los obtenidos en atmósfera de nitrógeno. De este modo, se reduce en un 43% la duración del proceso, para lograr en torno a un 80% de transformación de la hemoglobina en péptidos.

Las propiedades funcionales medidas en los péptidos presentan mejores resultados que los obtenidos con la hemoglobina nativa. La solubilidad fue mejorada, la capacidad emulsionante o bien permanece idéntica a la hemoglobina o bien mejora notablemente en el caso de péptidos producidos en atmósfera de oxígeno. Por otro lado, la capacidad gelificante ha sido completamente eliminada, siendo los péptidos obtenidos por hidrólisis física, incapaces de formar geles.

Con respecto a las propiedades antioxidantes (poder reductor, captura de radical hidroxilo y poder quelante), los mejores resultados fueron proporcionadas por la hemoglobina nativa, excepto en el caso del poder reductor, dónde los péptidos (especialmente los obtenidos en atmósfera de nitrógeno) muestran el doble de poder reductor que la hemoglobina. En cualquier caso, si lo que se pretende es aprovechar las propiedades antioxidantes para eliminar el estrés oxidativo resulta más adecuado usar aquellos péptidos, producidos con inyección de oxígeno.

#### **4.6 ESQUEMA DEL APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE LA SANGRE**

Una vez analizadas las propiedades funcionales de las proteínas de la sangre, tanto en su estado nativo como conjugadas con dextrano; y de haber aplicado diferentes técnicas para producir péptidos procedentes de hemoglobina purificada, se ha realizado un esquema en donde se indica toda la variedad de productos conseguidos a partir de un residuo de origen animal. Este esquema se ha plasmado en la Figura 45.

En este esquema se refleja como a partir de un producto de desecho como es la sangre, se pueden obtener una gran variedad de productos que pueden ser aplicados a la industria alimentaria. Todos estos productos pueden ser aplicados a diferentes fines en base a sus propiedades funcionales o antioxidantes previamente estudiadas.

Con lo que se consigue un doble efecto: por un lado se minimizan los niveles de contaminación debidos a vertidos tan contaminantes y por otro la elaboración de una serie de productos comercializables y de alto valor añadido. Este doble efecto repercute favorablemente en la economía del macelo, ya que se evitan pagar cánones por vertidos y además se consigue comercializar una amplia gama de productos que revierten favorablemente en el balance económico.

Como ejemplo de la variedad de productos obtenidos, en las siguientes imágenes, se muestra en la Figura 46 el aspecto que tienen las fracciones plasmáticas nativas y conjugadas (excepto la fracción FI); y en la Figura 47 la hemoglobina nativa y conjugada, globina coloreada precipitada y globina decolorada, así como los péptidos obtenidos por hidrólisis física. Así como una imagen de las fracciones plasmáticas antes y después de la conjugación.



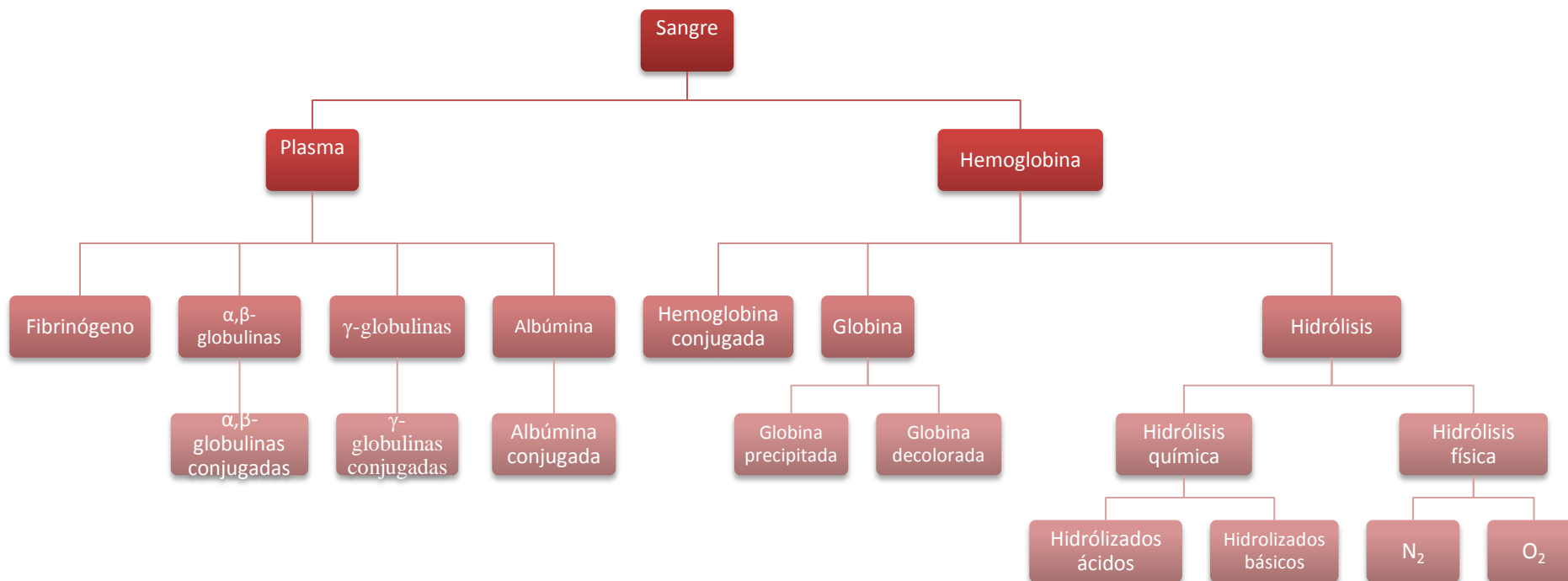
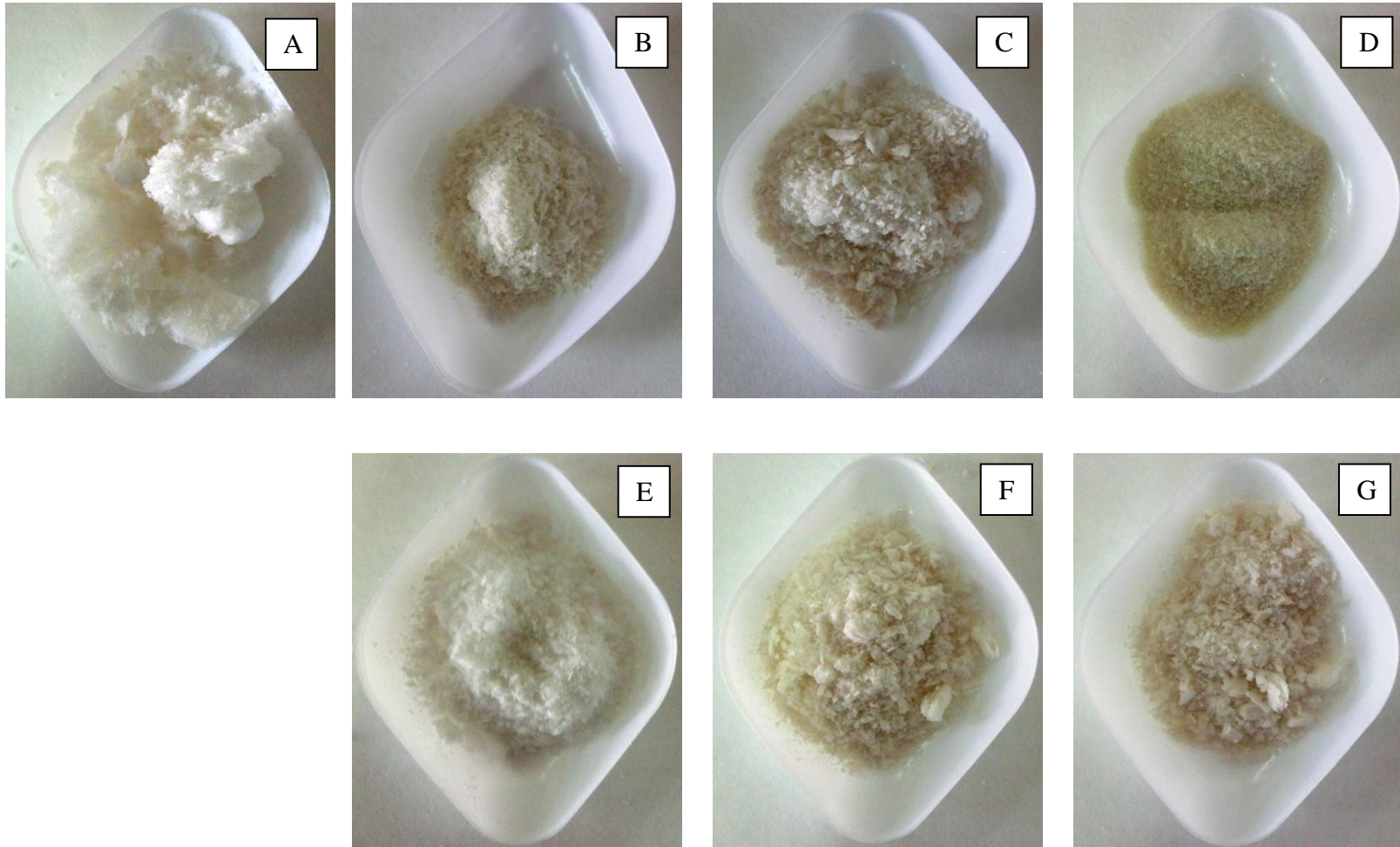
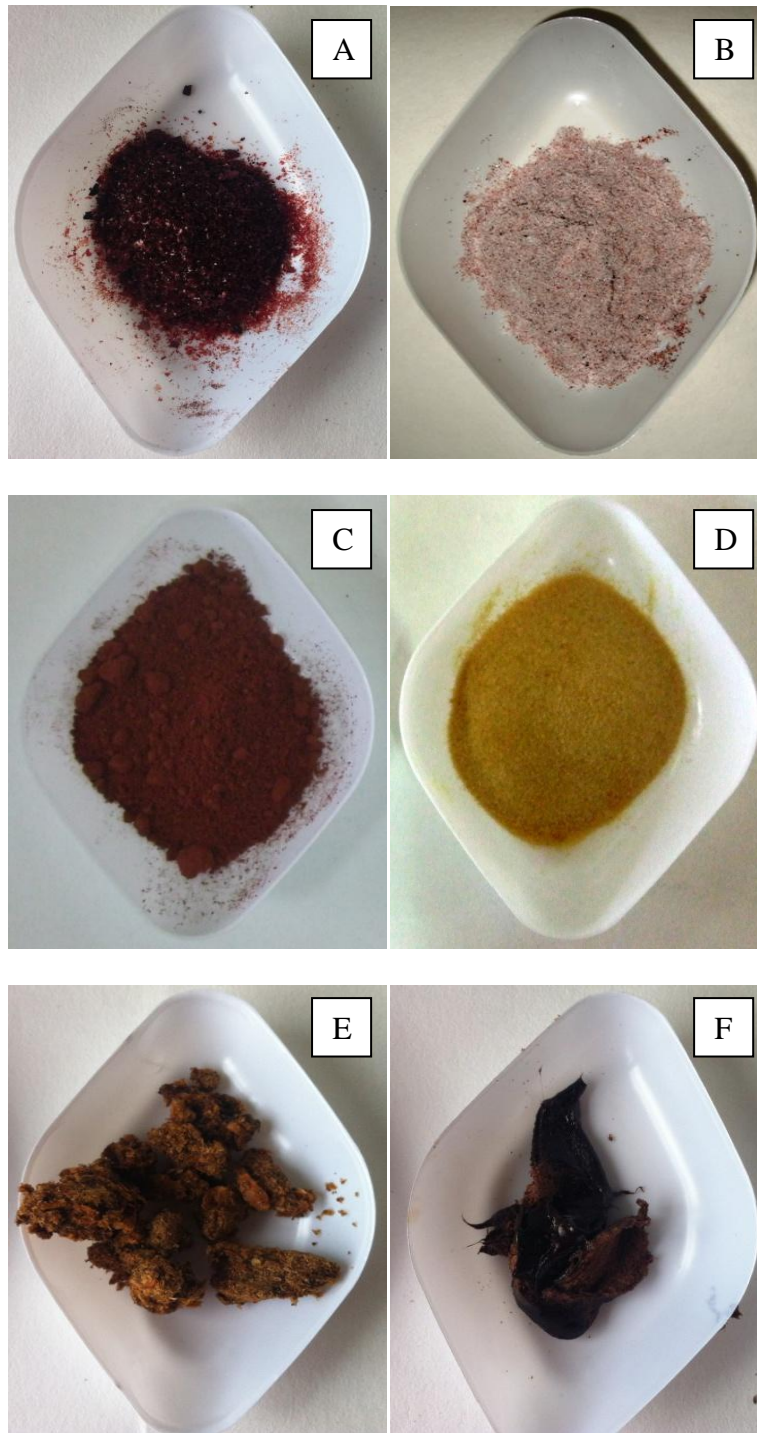


Figura 45. Diagrama de flujo del aprovechamiento integral de la sangre aplicando las técnicas desarrolladas en el presente trabajo.



*Figura 46: Fracciones del plasma nativas y conjugadas. FI (A), FII (B), FIII (C), FIV (D), FII conjugada (E), FIII conjugada (F) y FIV conjugada (G).*

4.- Discusión y resultados  
Aprovechamiento integral de la sangre



*Figura 47. Hemoglobina liofilizada (A), hemoglobina conjugada con dextrano (B), globina coloreada (C), globina decolorada (D), péptidos obtenidos mediante hidrólisis física con inyección de oxígeno (E) y nitrógeno (F).*

## *5.- Conclusiones Generales*



## 5.- CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se han investigado las posibilidades de aplicación de las proteínas sanguíneas en productos de alimentación en base a las diferentes propiedades funcionales ensayadas. También se estudió la reacción de Maillard para modificar dichas propiedades funcionales y buscar nuevas aplicaciones a las proteínas nativas. Por último se han ensayado varias técnicas para hidrolizar hemoglobina purificada y se han comparado en base a su rendimiento y al tamaño medio de los péptidos obtenidos; a la vez que se evaluaban sus propiedades antioxidantes y funcionales.

Los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo nos permiten extraer las siguientes conclusiones generales:

1. Las proteínas de sangre porcina, aisladas y purificadas por métodos químicos, han demostrado tener unas buenas propiedades espumantes, gelificantes, emulsionantes y una alta solubilidad; concretamente, el fibrinógeno presenta las mejores propiedades emulsionantes; la albúmina y la hemoglobina son las mejores espumantes y las globulinas presentes en las fracciones FII y FIII de Cohn son las que producen geles a una menor concentración. Por último, estas proteínas en conjunto, gelifican en un rango de temperatura que oscila entre 44 y 72°C.
2. Se ha demostrado que las mejores condiciones para obtener un conjugado proteína/dextrano es realizar la reacción a 80°C durante un tiempo que oscila entre los 90 y 140 minutos, según la proteína de que se trate. Bajo estas condiciones se consigue alcanzar una elevada reducción de los grupos amino libre: 50% para la fracción FII, 20% para la fracción FIII, 68% para la albúmina y un 10% para la hemoglobina.

3. La conjugación de proteínas sanguíneas con dextrano permite modificar las propiedades funcionales de las proteínas nativas en diferentes sentidos. Así, la solubilidad de los conjugados es menor que la de las proteínas nativas, mientras que la estabilidad térmica y capacidad emulsionante han sido incrementadas en todas las proteínas ensayadas. En cuanto a las propiedades gelificantes, se ha conseguido incrementar la temperatura a la que las proteínas comienzan a gelificar en 15 °C, lo que aumenta considerablemente su rango de aplicación. Los geles formados con conjugados presentan un LGC similar al de las proteínas nativas, pero con un sustancial descenso de su resistencia a la deformación.
4. El uso de ácidos para hidrolizar hemoglobina porcina purificada es una herramienta útil para producir grandes cantidades de péptidos. Los mejores resultados se obtienen empleando concentraciones 6 M de ácido. En el caso del ácido sulfúrico se obtiene un 60% de péptidos solubles de un tamaño medio de 17 kDa, mientras que con ácido clorhídrico el rendimiento es del 74%, pero el tamaño medio de los péptidos asciende a 23 kDa. Concentraciones menores de ácido producen una menor cantidad de péptidos y de un peso molecular superior. Se ha demostrado, en ambos casos, que los péptidos presentes en la fracción no soluble, presentan la misma distribución de tamaños que los péptidos solubles.
5. El hidróxido sódico se ha utilizado como agente hidrolizante a diferentes concentraciones. Queda demostrado que una concentración 6M es el medio más adecuado, ya que transforma el 82% de la hemoglobina en péptidos solubles de un tamaño medio de 14.5 kDa. Concentraciones de NaOH de 9M y 3M producen un rendimiento menor, del 60% y 68% respectivamente.
6. Se ha comprobado que mezclas de medios básicos y ácidos son viables para neutralizarse mutuamente y detener así la reacción. Con el beneficio añadido de

- tener disponibles en el producto final todos los aminoácidos presentes originalmente en la proteína sustrato.
7. A partir del estudio de los hidrolizados obtenidos se identificaron cuatro fracciones: SP (péptidos solubles), NSP (péptidos no solubles), Aa (aminoácidos) y Hb (hemoglobina). El estudio de la concentración de cada una de ellas, a lo largo del tiempo ha permitido desarrollar un modelo cinético que explica el mecanismo por el que tienen lugar los diferentes procesos involucrados.
  8. La temperatura y la atmósfera empleadas ( $O_2$  o  $N_2$ ) en el proceso de hidrólisis química ejercen una influencia en el tamaño medio de los péptidos y en el rendimiento obtenido. A una presión constante de 4 MPa y bajo una atmósfera de nitrógeno, a  $180^\circ C$ , se consigue un rendimiento del 83% y un peso medio de 3.2 kDa a las 7 horas de proceso. En atmósfera de oxígeno se obtiene un rendimiento del 83% y un peso medio de 2.2 kDa a las 4 horas. A temperatura más bajas ( $120$  y  $150^\circ C$ ) el rendimiento es menor, al tiempo que el tamaño medio de los péptidos es mucho mayor, situándose por encima de los 9 kDa.
  9. Se ha podido localizar un patrón cromatográfico en la hidrólisis física de la hemoglobina. Este patrón está influenciado por la temperatura del proceso y permanece constante a lo largo del mismo. A mayores temperaturas se consigue una mayor homogeneidad en el tamaño de los péptidos, lo que indica un alta exposición de puntos de hidrólisis. A  $120^\circ C$  de temperaturas se consiguen tamaños de péptidos más heterogéneos, lo que indica que la estructura de la proteína evita la exposición de dianas de hidrólisis.
  10. Las propiedades funcionales de los hidrolizados obtenidos mediante hidrólisis física a  $180^\circ C$  son dependientes de la atmósfera empleada. Bajo ambas



atmósferas la solubilidad es incrementada, en todo el rango de pH, con respecto a la hemoglobina nativa. La capacidad emulsionante solo se mejora cuando se emplea oxígeno, mientras que bajo atmósfera de nitrógeno los péptidos dieron un resultado similar al de la hemoglobina nativa. De forma adicional, independientemente de la atmósfera empleada, los péptidos formaban emulsiones del tipo o/w y w/o. La pérdida de color de los péptidos obtenidos fue mucho más notable bajo una atmósfera de oxígeno, siendo ésta del 95%, mientras que en atmósfera de nitrógeno fue del 80%.

11. Los péptidos obtenidos mediante hidrólisis física presentan unas buenas propiedades antioxidantes. Así, los dos tipos de péptidos obtenidos presentan unos valores competitivos de captura del radical hidroxilo, poder reductor y poder quelante muy similares. Estos resultados son ligeramente mejores para los péptidos que se obtienen bajo atmósfera de oxígeno.
12. Se ha podido demostrar que a través de diferentes procesos (fraccionamiento, conjugación, purificación e hidrólisis) se puede conseguir una amplia gama de productos aplicables a la industria alimentaria. De este modo, no solo se abren las puertas a la obtención de productos con valor añadido, si no que logra disminuir notablemente una de las principales fuentes de contaminación de la industria cárnica.

## *6.- Bibliografia*



1. Akhtar, M.; Dickinson, E. (2003). *Emulsifying properties of whey protein-dextran conjugates at low pH and different salt concentrations*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, **31**:125-132.
2. Aladesanmi, A. O.; Ojokan, E.O. (1997). *Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate*. Food Chemistry, **59(3)**: 333-338.
3. Albano, E. (2006) *Alcohol, oxidative stress and free radical damage*. Proceedings of the Nutrition Society, **65**: 278-290.
4. Alvarez, C.; Bances, M.; Rendueles, M.; Díaz, M. (2009). *Functional properties of isolated porcine blood proteins*. International Journal of Food Science & Technology, **44(4)**: 807-814.
5. Andújar, G.; Herrera H.; Roca, M. (1983). *Conservación de la sangre entera, plasma y corpúsculos por adición de sal*, Alimentaria, **39**, 271.
6. Aoki, T.; Hiidome, Y.; Sugimoto, Y.; Ibrahim, H; Kato, Y. (2001). *Modification of ovoalbumina with oligogalacturonic acids trough the Maillard reaction*. Food Research Interational, **34**: 127-132.
7. Balny, C.; Masson, P. (1993). *Effects of high pressure on proteins*. Food Review International, **9**: 611 –628.
8. Baldwin, R. E; Sinthavalai, S. (1974). *Fish protein concentrates foam*. Journal of Food Science **39**: 880-882.
9. Bautista, J.; Corpas, R.; Cremades, O.; Hernandez-Pinzon, I.; Romos, R.; Villaneuva, A. (2000). *Sunflower protein hydrolysates for dietary treatment of patients with liver failure*. Journal of American Oil Chemical Society, **77**: 121–126.
10. Bast, A.; Haenan, G.R. (2002). *The toxicity of antioxidants and their metabolites*. Enviromental Toxicology and Pharmacology, **11**: 251-258.

11. Baydar, N.G.; Özkan, G.; Yaçar, S. (2007). *Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts*. Food Control, **18**: 1131-1136.
12. Benjakul, S.; Lertittikul, W.; Bauer, F. (2005). *Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-sugar model system*. Food Chemistry, **93**: 189-196.
13. Berkaloff, Bourget, Lacroix (1988), *Biología y Fisiología Celular*, **1**, Ed. Omega, Barcelona.
14. Bizzotto, C.S.; Capobiango, M.; Silvestre, M.P.C. (2005) *Evaluation of functional properties of a blood protein*. Pakistan Journal of Nutrition, **4(1)**: 11-16.
15. Borkenhagen, L. K. (1953). *Process for preparing amino acids*. United States Patent number 2,657,232.
16. Byun, H.-G.; Lee, J.K.; Park, H.G.; Jeon, J.-K.; Kim, S.-K. (2009) *Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, Brachionus rotundiformis*. Process Biochemistry, **44**: 842-846.
17. Campbell, L.; Raikos, V.; Euston, S. (2003). *Modification of functional properties of egg-white proteins*. Nahrung **47(6)**: 369-376.
18. Campel, N.; Aubry, J.M.; Piot, J.M.; Guillochon, D. (1994). *Preparation of Photodynamic Hydrolysates from Bovine Hemoglobin*, Journal of Agriculture Food Chemistry, **42(9)**: 2059-2063.
19. Campel, N.; Aubry, J.M.; Piot, J.M.; Guillochon, D. (1994). *Photophysical and Photobiological Activities of a porphyrin peptide fraction derived from Haemoglobin*. Journal of Photochemistry and Photobiology, **26**, 141-146.
20. Catiau, L.; Traisnel, J.; Delval-Dubois, V.; Chihib, N.-E.; Guillochon, D.; Nedjar-Arroume, N. (2011). *Minimal antimicrobial peptidic sequence from hemoglobin alpha-chain: KYR*. Peptides, **32**: 633-638.

21. Cenzano, I., Madrid, J.M. (1991). *Subproductos Cárnicos: Definición y Composición (I)*, Alimentación, equipos y tecnología, Septiembre, 81-90.
22. Chang, C.-Y.; Wu, K.-C.; Chiang, S.-H. (2007). *Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysis*. Food Chemistry. **100(4)**: 1537-1543.
23. Chaudiere, J.; Ferrari-Illou, R. (1999). *Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms*. Food Chemistry and Toxicology, **3**: 949-962.
24. Cheftel J. C - Cuq J. L -. Lorient D. (1989). Food proteins. Ed Acribia, S.A, Spain p 50-75.
25. Cheftel, J. C.; Cuq, J. L.; Lorient, D. (1989). *Proteínas Alimentarias*, Ed. Acribia S.A., Zaragoza, 221-233.
26. Clemente, A. (2000). *Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition*. Trends in Food Science and Technology, **11**: 254–262.
27. Coffman C., García V. (1977). *Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour*. Journal of Food Technology. **12**: 473-487.
28. Cohn, E.J.; Strong, L.E.; Hughes, W.L.; Mulford, D.J.; Asworth, J.N.; Melin, M.; Taylor, H.L. (1946). *Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids*. Journal of the American Chemical Society **68**: 459-463.
29. Crenwelge, D.D.; Dill, C.W.; Tybor, P.T.; Landman, W.A. (1974). *A comparison of the emulsification capacities of some protein concentrates*. Journal of Food Science, **39**: 339-354.
30. Cordobés, F.; Partal, P.; Guerrero, A. (2004). *Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels*. Rheological Acta, **43(2)**: 184–195.

31. Dávila, E. ; Parés, D.; Cuvelier, G. ; Relkin, P. (2006). *Heat-Induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH*. Meat Science, **76**: 216-225.
32. Dávila, E.; Toldrá, M.; Saguer, E.; Carretero, C.; Parés, D. (2006). *Characterization of plasma protein gels by means image of analysis*. LWT **40**: 1321-1329.
33. De Vouno, M.; Penteado, C.; Lajolo-Franco, M.; Pereira dos Santos, N. (1975). *Functional and Nutritional Properties of Isolated Bovine Blood Proteins*. Journal of Science and Food Agriculture, **30(8)**: 809-815.
34. Delaney, R.A.M. (1997). *Protein concentrates from slaughter animal blood. I. Composition and properties of spray dried red blood cell concentrates*, Journal of Food Technology, **12**, 339-354.
35. Delaney, R.A.M. (1997). *Protein concentrates from slaughter animal blood. II. Preparation and purification of red cells concentrates*, Journal of Food Technology, **12**, 355-368.
36. Dill, C.W.; Tybor, P.T.; Landman, W.A. (1973). *Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried protein concentrates*, Journal of Food Science. **38**: 4-6.
37. Dinis, T.C.P.; Madeira, V.M.C.; Almeida, L.M. (1994). *Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **315**: 161–169.
38. Directiva 2008/98/CE: relativa a residuos industriales.
39. Directiva 1996/61/CE: relativa a la prevención y al control integrado de la contaminación.
40. Dive, D.; Piot, J.M.; Sanner, F.; Gullochon, D.; Charet, P.; Lutrat, S. (1989). *Use of hemoglobin enzymic hydrolysates, prepared on a pilot plant scale, as a nitrogen*

- source for the cultivation of three species of Tetrahymene*, Enzyme Microbiology and Technology, **11**: 165-169.
41. Dorman, H.J.D.; Peltoketo, A.; Hiltunen, R.; Tikkanen, M.J. (2003). *Characterization of the antioxidant properties of deodorized aqueous extracts from selected Lamiaceae Herbs*. Food Chemistry, **83**: 255-262.
42. Dreher, D.; Junod, A.F. (1996). *Role of oxygen free radicals in cancer development*. European Journal of Cancer, **32**: 30-35.
43. Duh, P.D. (1998) *Antioxidant activity of burdock (Arctium lappa Line): its scavenging effect on free-radical and active oxygen*. Journal of the American Oil Chemistry Society, **75**: 455-461.
44. Duh, P.D.; Du, P.C.; Yen, G.C. (1999). *Action of methanolic extract of mung bean hulls as inhibitors of lipid peroxidation and non-lipid oxidative damage*. Food and Chemical Toxicology, **37**: 1055-1061.
45. Esteban, M.B.; García, A.J.; Ramos, P.; Márquez, M.C. (2010). *Sub-critical water hydrolysis of hog hair for amino acid production*. Bioresource Technology, **101**: 2472-2476.
46. Farreras, P. (1992), *Medicina Interna*, Ed. Doyma S.A., Madrid, 2, 1571-1581.
47. Fernández, A.; Díaz, M. (1995). *Aprovechamiento de Residuos de la Industria Alimentaria*, Alimentación: equipos y tecnología, Abril, 105-111.
48. Fields, R. (1971). *The measurement of amino groups in proteins and peptides*. Biochemical Journey, **124**: 581-590.
49. Flork, M. (1989). *Industrial process for the preparation of amino acids by hydrolysis of proteins in acid medium*. Unites States Patent number 4,874,893.
50. Fountoulakis, M.; Hans-Werner, L. (1998). *Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins*. Journal of Chromatography A., **826**: 109–134.



51. Gauthier, S.F.; Vachon, C.; Savoie, L. (1986). *Enzymatic conditions of an in vitro method to study protein digestion*. Journal of Food Science, **51**: 960–964.
52. Gordon, H.M. (1990). *The mechanism of the antioxidant action in vitro*. Food Antioxidants. New York, Elsevier:1-18.
53. Halliwell, B.; Murcia, H.A.; Chirco, S.; Aruoma, O.I. (1995). *Free radicals and antioxidants in food in vivo: what they do and how they work*. Critical reviews in Food Science and Nutrition, **35**: 7-20.
54. Haurowltz, F. (1969). *Química y función de las Proteínas*, Ed. Omega, Barcelona, 198-210.
55. Heremans, K.; Smeller L. (1998). *Protein structure and dynamics at high pressure* Biochimica et Biophysica Acta, **1386**: 353-370.
56. Hogan, S.; Zhang, L.; Li, J.; Wang, H.; Zhou, K. (2009). *Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effect on lipid peroxidation in cooked beef*. Food Chemistry, **117(3)**: 438-443.
57. Howell, K.N.; Lawrie, R.A. (1983). *Functional aspects of blood plasma proteins. I. Separation and characterization*. Journal of Science and Food Technology. **18**: 747-762.
58. Hughes, G. S.; Francom, S. F.; Antal, E. J.; Adams, W. J.; Locker, P. K.; Yancey, E. P.; Jacobs, E.E. (1995). *Hematologic effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in normal male and female subjects*. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, **126(5)**: 444-451.
59. In, M.-J.; Chae, J. H.; Oh, N.-S. (2002). *Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin*. Bioresource Technology, **84**: 63-68.

60. Inklaar, P.; Fortuin, A. (1969). *Determining the emulsifying and emulsion stabilizing capacity of protein meta additives*. Journal of Food Technology, **23**: 103-107.
61. Je, J.-Y.; Qian, Z.-J.; Byun, H.-G.; Kim, S.-K. (2007). *Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis*. Process Biochemistry, **42**: 840-846.
62. Jung, S.H.; Choi, S.J.; Kim, H.J.; Moon, T.W. (2006). *Molecular Characteristics of Bovine Serum Albumin-Dextran Conjugates*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, **70(9)**: 2064-2070.
63. Jimenez-Castaño, L., Villamiel, M., López-Fandiño, R. (2007). *Glycosilation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass*. Food Hydrocolloids, **21**: 433-443.
64. Katayama, S.; Shima, J.; Saeki, H. (2002). *Solubility improvement of shellfish muscle proteins by reaction with glucose and its soluble state in low-ionic strength medium*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **50**: 4327-4332.
65. Kato, A.; Murata, K.; Kobayashi, K. (1993). *Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state*. Journal of Agriculture and Food Chemical, **41**: 540-543.
66. Kitts, D.D. (2005). *Antioxidant properties of casein-phosphopeptides*. Trends in Food Science and Technology, **16**: 549-554.
67. Kolb, E. (1976), *Fisiología Veterinaria*, Ed. Acribia S.A., Zaragoza, 423-456.
68. Laca, A.; Paredes, B.; Díaz, M. (2010). *A method of egg yolk fractionation. Characterization of fractions*. Food Hydrocolloids, **24(4)**: 434-443.
69. Laemmli, U.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, **227**: 680-685.

70. Lai, L.S.; Chou, S.T.; Chao, W.W. (2001). *Studies on the antioxidative activities of hsian-tsao (Mesona procumbens Hemsl) leaf gum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **49(2)**: 963-968.
71. Lamsal, B.P.; Jung, S.; Johnson L.A. (2007). *Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis*. LWT, **40**: 1215-1223.
72. Lee, S.-H.; Song, K. B. (2009). *Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein*. Process biochemistry. **44**: 378-381
73. Linden G, Lorient D. (1994). Biochimie agro-industrielle. Ed. Masson Editeur S.A. Paris.
74. Liu, Q.; Kong, B.; Xiong, Y.L.; Xia, X. (2010). *Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis*. Food Chemistry, **118(2)**: 403-410.
75. Liu, T. X.; Wang, J.; Zhao M. M. (2010). *In vitro haem solubility of red cell fraction of porcine blood under various treatments*. International Journal of Food Science & Technology, **45**: 719-725.
76. Liu, X. Q.; Yonekura, M.; Tsutsumi, M.; Sano, Y. (1996). *Physicochemical Properties of Aggregates of Globin Hydrolysates*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **44**: 2957-2961.
77. Marshall, W.E. 1994, Amino acids, peptides and proteins, In I.Goldberg (Ed.), Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals (pp. 242–260). New York: Chapman and Hall.
78. Martín Yero (1995). *Tecnología de la Deshidratación de la Sangre y sus Fracciones*, Alimentaria, Marzo, 49-53.
79. Mc Cabe, W.L.; Smith, J.C.; Harriot, P. (1991). *Operaciones Básicas de Ingeniería Química* Ed. Mc Graw-Hill, New York, 997-1000.

80. Mierzejewska, D.; Mitrowska, P.; Rudnicka, B.; Kubicka, E.; Kostyra, H. (2008). *Effect of non-enzymatic glycosilation of pea albumins on their immunoreactives properties*. Food Chemistry, **111**: 127-131.
81. Moure, A.; Domínguez, H.; Parajo, J.C. (2006). *Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates*. Process Biochemistry, **41**: 447-456.
82. Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Dominguez, J.M.; Sineiro, J.; Dominguez-Nuñez, H.; Parajo, J.C. (2001). *Natural antioxidants from residual sources*. Food Chemistry, **72**: 145-171
83. Moure, F.; Rendueles, M; M. Díaz. (2003), *Coupling process for plasma protein fractionation using ethanol precipitation and ion exchange chromatography*. Meat Science, **64(4)**: 391-398.
84. Nedjar-Arroume, N.; Guillochon, D.; Piot, J.-M.; Thomas, D. (1991). *Stabilizing Effect of Organic Solvents on Oxyhemoglobin*, Applied Biochemistry and Biotechnology, **13**: 303-314.
85. Ockerman, H.W.; Hansen, C.L. (1994). *Industrialización de Subproductos de Origen Animal*, Ed. Acribia S.A., Zaragoza, 239-252.
86. Oliver, C.M.; Melton, L.D.; Stanley R.A. (2006). *Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, **46**: 337-350.
87. Oord van den, A.H.A.; Wesdorp, J.J. (1979) Decolouration of slaughterhouse blood by treatment with hydrogen peroxide. Proceedings of the 25<sup>th</sup> European Meeting of Meat Research Workers, Budapest, Hungary. 827-828.
88. Ozols, J. (1990). *Methods in Enzymology*. Deutscher, Editor, Vol. 182, Academic Press, San Diego.

89. Piot, J.-M.; Guillochon, D.; Zhao, Q. (1989) *Identification of peptides from a peptic Haemoglobin Hydrolysate Produced at Pilot-Plant Scale by High-Performance Liquid and Mass Chromatography*. Journal of Chromatography B., **481**: 221-231.
90. Prandl, O.; Fischer, A.; Schmidhofer, T. (1994). *Tecnología e Higiene de la Carne*, Ed. Acribia S.A., Zaragoza, 7-73.
91. Quirós, A.; Chichón, R.; Recio, I.; López-Fandiño, R. (2007). *The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin*. Food Chemistry, **104(4)**: 1734-1739.
92. Ravindran, G.; Bryden, W.L. (2004). *Tryptophan determination in proteins and feedstuffs by ion exchange chromatography*. Food Chemistry, 89: 309–314.
93. Real Decreto 509/1996: por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas.
94. Reglamento (CE) 1774/2002: por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.
95. Reglamento (CE) 808/2003: por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano
96. Rendueles, M.; Moure, F.; Fernández, A.; Díaz, M. (1997). *Preliminary studies on the processing of slaughter-house blood for protein recovery*. Resource and Environmental Technology, **1**: 193-206.
97. Rich, L.M.; Foegeding, E.A. (2000). *Effects of sugars on whey protein gelation*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **48**: 5046-5052.
98. Rodiles-López, J.O.; Arroyo-Maya, J.I.; Jaramillo-Flores, M.E.; Gutiérrez-López, G.F.; Hernández-Arana, A.; Barbosa-Cánovas, G.V.; Niranjana, K.; Hernández-

- Sánchez, H. (2010). *Effects of high hydrostatic pressure on the structure of bovine  $\alpha$ -lactalbumin*. Journal of Dairy Science, **93**: 1420-1428.
99. Rogalinski, T.; Herrmann, S.; Brunner, G. (2005). *Production of amino acids from bovine serum albumin by continuous sub-critical water hydrolysis*. Journal of Supercritical Fluids, **36**, 49–58.
100. Rosen, H. (1957). *A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids*. Archives of Biochemistry and Biophysics, **67(1)**: 10-15.
101. Saeki, H.; Inoue, K. (1997). *Improved solubility of carp myofibrillar proteins in low ionic strength medium by glycosylation*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **45**: 3419-3422.
102. Sasahara, K.; McPhie, P.; Minton A.P. (2003). *Effect of Dextran on Protein Stability and Conformation Attributed to Macromolecular Crowding*. Journal of Molecular Biology, **326(4)**: 1227-1237.
103. Selmane, D. Christophe, V.; Gholamreza, D. (2008). *Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties*. Meat Science, **79**: 640-647.
104. Sereewatthanawut, I.; Prapintip, S.; Wachiraruji, K.; Goto, M.; Sasaki, M.; Shotipruk, A. (2008) *Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis*. Bioresource Technology, **99**: 555-561.
105. Silva, S.; Weber, G. (1993). *Pressure stability of proteins*. Annual Review in Physical Chemistry, **44**: 89 –113.
106. Simonian, N.A.; Coyle, J.T. (1996). *Oxidative stress in neurodegenerative diseases*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, **36**: 83-106.
107. Smeller, L. (2002) *Pressure/temperature phase diagrams of biomolecules* Biochimica et Biophysica Acta, **1595**: 11-29.

108. Spector, A. (2000). *Review: Oxidative stress and disease*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, **16(2)**: 193-201
109. Stauton, E., *Bioquímica Médica*, E. Interamericana, 1969, 431-445.
110. Suetsuna, K.; Ukeda, H.; Ochi, H. (2000). *Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein*. The Journal of Nutrition Biochemistry, **11(3)**: 128-131.
111. Su, R.-X.; Qi, W.; He, Z.-M. (2007). *Time-dependent nature peptic hydrolysis of native bovine hemoglobin*. European Food Research Technology, **225**: 637-647.
112. Sun, Q.; Shen, H.; Luo, Y. (2011) *Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin*. Journal of Food Science and Technology, **48(1)**: 53-60.
113. Sun, Y.; Hayakawa, S.; Izumori, K. (2004). *Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the Maillard reaction: effect on protein structure and gel properties*. Journal of Agriculture Food Chemistry, **52**:1293-1299.
114. Synowiecki, J.; Jagielka, R.; Shahidi, F. (1996). *Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction*. Food Chemistry, **57(3)**: 435-439.
115. Tauzin, J.; Miclo, L.; Roth, S.; Mollé, D.; Gaillard, J.-L. (2003). *Tryptic hydrolysis of bovine S2-casein: identification and release kinetics of peptides*. International Dairy Journal, **13**: 15–27.
116. Tedford, L.-A.; D. Smith, D.; Schaschke, C.J. (1999). *High pressure processing effects on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme and b-lactoglobulin*. Food Research International, **32**: 101-106.
117. Toldrá, M.; Parés, M.; Saguer, E.; Carretero, C. (2011). *Hemoglobin hydrolysates from porcine blood obtained through enzymatic hydrolysis assisted by high*

- hydrostatic pressure processing*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, **12(4)**: 435-442.
118. Tsai, S.-Y.; Tsai, H.-L.; Mau, J.-L. (2007). *Antioxidant properties of Agaricus blazei, Agrocybe cylindracea and Boletus edulis*. LWT, **40**: 1392-1402.
119. Tybor P.T.; Dill, C.W.; Landmann W.A. (1973). *Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried protein concentrates*, Journal of Food Science, **38**: 4-6.
120. Tybor, P.T.; Dill, C.W.; Landmann W.A. (1975). *Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous pilot process*. Journal of Food Science. **40**: 155-159.
121. Vaghefi, N.; Fouzia, N.; Guillochon, D.; Bureau, F.; Arhan, P.; Bouglé, D. (2002). *Influence of the Extent of Hemoglobin Hydrolysis on the Digestive Absorption of Heme Iron. An in Vitro Study*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, **50**: 4969-4973.
122. Valerie, L.-P.; Balnyb, C. (2002). *High-pressure as a tool to study some proteins' properties: conformational modification, activity and oligomeric dissociation*, Innovative Food Science and Emerging Technologies **3**: 209–221.
123. Van der Plancken, I; Van Loey, A.; Hendrickx, M.E. (2005). *Combined effect of high pressure and temperature on selected properties of egg white proteins*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, **6**: 11–20.
124. Vijayalakshmi, M. A.; Lemieux, L; Amoit, J. (1986). *High performance size exclusion liquid chromatography of small molecular weight peptides from protein hydrolysates using methanol as a mobile phase additive*. Journal of Liquid Chromatography, **9**: 3559–3576.



125. Walter, W.; Harke, H.-P.; Polchow, P. (1967). *Alanin,  $\alpha$ -Aminobuttersaure, Leucin, Phenylalanin und Asparaginsäure unter hydrothermalen Bedingungen*. Zeitschrift für Naturforschung, **22(9)**: 931–937.
126. Wang J.C.; Xing G.S.; Hu, W.D.; Zhu, T.L.; Wang, Q.; Zhao H. (1994). *Effects of Ge-132 on oxygen free radicals and the lipid peroxidation induced by hydroxyl free radical in vitro*. Chinese Pharmaceutical Journal, **29**: 23-25.
127. Wang, J.-S.; Zhao, M.-M.; Yang, X.-Q.; Jiang Y.-M.; Chun, C. (2007). *Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction*. Food hydrocolloids, **21**: 174-179.
128. Wismer-Pedersen, J. (1979). *Use of haemoglobin in foods utilization of animal Blood in Meat Products*. Food technology, **33(8)**: 76-80.
129. Williams, P.E.V. (1995). *Digestible amino acids for non-ruminant animals: theory and recent challenges*. Animal Feed Science and Technology, **53**: 173-187.
130. Wooster, T.; Augustin, M.A. (2007). *Rheology of whey protein–dextran conjugates films at the air/water interface*. Food Hydrocolloids, **21(7)**: 1072-1080.
131. Xian, Z.; Chao, Z.; Liang, Z.; Cheng, H. (2008). *Amino Acids Production from Fish Proteins Hydrolysis in Subcritical Water*. Chinese Journal of Chemical Engineering, **16(3)**: 456-460.
132. Xie, Z.; Huang, J.; Xu, X.; Jin, X. (2008). *Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate*. Food Chemistry, **111**: 370-376.
133. Yang, J.-H.; Lin C.-W. (1998). *Functional properties of porcine blood globin decolorized by different methods*. International Journal of Food Science and Technology, **33(4)**: 419-427.

134. Yen, G.C.; Chen, H.Y. (1995). *Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **43(1)**: 27–32.
135. Yu, H.-H.; Liu, X.-G.; Xing, R.; Liu, S.; Guo, Z.-Y.; Wang, P.-B.; Li, C.-P.; Li, P.-C. (2006). *In vitro determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish *Rhopilema esculentum**. Food Chemistry, **1**: 123-130.
136. Yu, Y.; Hu, J.; Xuefeng, B.; Yuguang, D.; Bingcheng, L. (2006). *Preparation and function of oligopeptide-enriched hydrolysate from globin by pepsin*. Process Biochemistry, **41**: 1589-1593.
137. Yu, Y.; Hu, J., Miyaguchi, Y.; Bai, X.; Dua, Y.; Lin, B. (2006). *Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from porcine hemoglobin*. Peptides. **27**: 2950-2956.
138. Zeece, M.; Huppertz, T.; Kelly, A. (2008) *Effect of high-pressure treatment on in-vitro digestibility of  $\beta$ -lactoglobulin*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, **9**: 62–69.
139. Zheng, W.; Wang, S.Y. (2001). *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **49(11)**: 5165-5170.
140. Zhou, J.F.; Yan, X.F.; Guo, F.Z.; Sun, Y.N.; Qian, Z.J.; Ding, D.Y. (2000). *Effect of cigarette smoking and smoking cessation on plasma constituents and enzyme activities related to oxidative stress*. Biomedical and Environmental Sciences, **13(1)**: 44-55.



## *7.- Publicaciones*



El trabajo experimental realizado durante la presente tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones, que se enumeran a continuación.

- **Alvarez, C.;** Bances, M.; Rendueles, M.; Díaz, M. (2009). *Functional properties of isolated porcine blood proteins*. International Journal of Food Science & Technology, **44(4)**: 807-814.

Además del artículo mencionado han sido enviados para su publicación los siguientes:

- **Alvarez, C.;** García, V.; Rendueles, M.; Díaz, M. (en revisión) *Functional properties of isolated porcine blood proteins modified by Maillard's reaction*. Food Hydrocolloids.
- **Alvarez, C.;** M.; Rendueles, M.; Díaz, M. (en revisión) (en revisión) *The yield of peptides and aminoacids following acid hydrolysis of haemoglobin from porcine blood*” Animal production Science.

Así mismo se incluyen las siguientes comunicaciones en congresos:

- Póster en Biotech'08, Granada (Spain): “*Hydrolysis of porcine globin for food uses*”
- Póster en XXXII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química (Oviedo, 2009): “*Mejora de las propiedades funcionales de proteínas plásmaticas mediante conjugación con dextrano*”

- Póster en 1<sup>st</sup> European Congress of Applied Biotechnology (2011) en Berlín: “Production of peptides from porcine haemoglobin by hydrolysis at high pressure and temperature in modified atmospheres”.
  
- Exposición oral en el octavo congreso mundial de Ingeniería Química (Quebec, 2009): *Peptides Distribution in Neutralized Acid Hydrolysis of Residual Blood Porcin Hemoglobin.*
  
- Exposición oral en el XXXII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (Oviedo, 2009): “*Conjugación de hidratos de carbono con hemoglobina porcina. Interacciones y propiedades*”

*Anexos*





## **ANEXOS**

### **I- DISPOSICIONES LEGALES SOBRE EL USO DE LOS DERIVADOS DE SANGRE**

Tras la aparición en el Reino Unido, en 1986, del primer caso de Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), nombre científico de la enfermedad conocida coloquialmente como “enfermedad de las vacas locas” se empezaron a tomar medidas para evitar la propagación de la misma. La aparición de esta enfermedad ha supuesto muertes y pérdidas millonarias en el sector cárnico en Gran Bretaña, lo que también ocurrió en España en el año 2000, cuando se detectó el primer caso de EEB en Galicia. Las medidas adoptadas se basaban en impedir la entrada del agente patógeno en la cadena de alimentación animal, estableciéndose diferentes actuaciones, como son la detección y eliminación de todos los animales afectados o sospechosos de estarlo, eliminación y destrucción de los MER (materiales específicos de riesgo) y la prohibición de la utilización de harinas animales elaboradas en la alimentación de los rumiantes. Concretamente, y con respecto a la utilización de subproductos cárnicos en la elaboración de piensos para animales, el Reglamento (CE) N° 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002, establece la siguiente norma sanitaria:

“Los científicos sugieren que la práctica de la alimentación de una especie animal con proteínas derivadas de cuerpos o partes de cuerpos de la misma especie presenta un riesgo de transmisión de la enfermedad. Por consiguiente, se debe prohibir esta práctica como medida cautelar. Deben adoptarse normas de desarrollo que garanticen la necesaria separación, en cada fase de la transformación, del almacenamiento y del transporte, de los subproductos animales destinados a ser utilizados en piensos. No

obstante, debe existir cierto margen para establecer excepciones a esta prohibición general en relación con el pescado y los animales de peletería si el asesoramiento científico lo justifica”

Por tanto, a raíz de la aparición de este Reglamento, se prohibió el uso de la sangre como ingrediente de los piensos usados en alimentación de animales destinados a consumo humano, pudiendo utilizarse únicamente en piensos destinados a animales de compañía.

Los residuos generados actualmente en los mataderos, se clasifican en tres categorías, tal y como marca el RD 1774/2002 y el Reglamento(CE) N° 1994/2002, por los que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos de animales no destinados a consumo humano:

#### 1. RESIDUOS CON CATEGORÍA 1 - MER

Los MER o materiales específicos de riesgo son los tejidos donde podrían encontrarse los priones, proteína infecciosa que es el agente causante de la enfermedad EEB, si el animal estuviera infectado. Por tanto, como medida de precaución ante la enfermedad de las vacas locas, aunque los animales sean sanos y aptos para el consumo, después de su sacrificio se separan los MER a fin de que no entren a la cadena alimentaria ni puedan llegar a los lugares de venta a los consumidores. En el Real Decreto 1139/2003 se establece la lista de órganos de los bovinos, ovinos y caprinos que se consideran como MER. Ejemplo de estos residuos son la cabeza, el íleon, las amígdalas o la médula de las reses. Dicha legislación establece también el tratamiento al que deben ser sometidos a fin de destruir los priones. Por ejemplo, se consideran adecuados los tratamientos térmicos a 133°C y 3 bares de presión, durante un tiempo ininterrumpido de 20 minutos.

## 2. RESIDUOS CON CATEGORÍA 2

Este grupo de subproductos de matadero lo constituye el contenido intestinal, del rumen y del estómago, lo que coloquialmente se conoce como estiércoles. También pertenecen a este grupo la leche y el calostro, siempre que éstos no presenten ningún riesgo de propagar enfermedades transmisibles. Este grupo de residuos pueden ser utilizados sin transformar como materia prima en una instalación de biogás o de compostaje, pero nunca pueden ser empleados en la alimentación animal.

## 3. RESIDUOS CON CATEGORÍA 3

Este grupo lo constituyen aquellos subproductos no considerados como peligrosos, tales como:

- Partes de animales sacrificados que sean aptas para el consumo humano pero que no se destinen a este fin por motivos comerciales (sebos, vísceras, etc.)
- Pieles, pezuñas, plumas, lana, cuernos y pelo procedentes de animales que no presenten signos clínicos de ninguna enfermedad transmisible a través de ese producto a los seres humanos o los animales.
- Subproductos animales derivados de la elaboración de productos destinados al consumo humano, incluidos los huesos desgrasados y los chicharrones.
- Sangre procedente de animales que no sean rumiantes sacrificados en un matadero, tras haber sido sometidos a una inspección ante mortem y que a resultas de dicha inspección sean declarados aptos para el sacrificio con vistas al consumo humano de conformidad con la normativa comunitaria.

Por tanto, la sangre procedente de porcino sano sacrificados en un matadero, cuya valorización es el objeto de estudio de este trabajo, se encuentra clasificado como residuo no peligroso de tipo 3.

En la Directiva 96/25/CE(1) se define como "material para pienso" aquellos materiales que son de origen animal, incluyen las proteínas animales transformadas, los hemoderivados, las grasas extraídas, el aceite de pescado, los derivados de las grasas, la gelatina y las proteínas hidrolizadas, el fosfato dicálcico, la leche, los productos lácteos y el calostro. Otras definiciones que aparecen en el Anexo I del Reglamento 1774/2002 y que consideramos de interés para este proyecto son:

- "productos derivados de la sangre": productos derivados de la sangre o las fracciones de la sangre, con exclusión de la harina de sangre; éstos incluyen plasma seco, congelado o líquido, sangre entera desecada y hematíes secos, congelados o líquidos o sus fracciones y mezclas;
- "sangre": sangre fresca entera;
- "harina de sangre": productos hemoderivados obtenidos mediante el tratamiento térmico de la sangre con arreglo al capítulo II del anexo VII y destinados al consumo animal o a su utilización como abonos orgánicos.

En el Artículo 22 del citado Reglamento se recogen las restricciones de uso de los subproductos de categoría 3. Así, quedan prohibidos los siguientes usos de subproductos animales y productos transformados de animales:

- a) la alimentación de especies con proteínas animales transformadas derivadas de animales o partes de animales de la misma especie;

- b) la alimentación de animales de granja distintos de los animales de peletería con residuos de cocina o piensos que contengan residuos de cocina o se deriven de ellos, y
- c) la aplicación de abonos y enmiendas del suelo orgánicos, con excepción del estiércol, a los pastos.

Excepcionalmente, se puede usar este tipo de subproductos en alimentos para peces y para animales de peletería, previa consulta al Comité científico pertinente.

Así mismo, el Reglamento CE nº1774/2002 indica que Para la obtención de productos hemoderivados sólo puede emplearse como materia prima la sangre de:

- a) partes de animales sacrificados que se consideren aptos para el consumo humano de conformidad con la normativa comunitaria, pero no se destinen a este fin por motivos comerciales;
- b) partes de animales sacrificados que hayan sido rechazadas por no ser aptas para el consumo humano, pero que no presenten ningún signo de enfermedad transmisible a los seres humanos o los animales y que procedan de canales que son aptas para el consumo humano de conformidad con la normativa comunitaria;

#### **I-A Métodos de transformación**

Los productos hemoderivados deberán haber sido sometidos a un proceso de transformación que vienen convenientemente indicados en el Capítulo III del Anexo V del Reglamento CE nº 1774/2002. Dichos tratamientos garantizan que el producto

cumple las normas microbiológicas fijadas en el apartado 10 del capítulo I de dicho Anexo.

Los métodos de transformación indicados en dicho Anexo V se basan en la reducción del producto al tamaño final deseado o en tratamientos de presión, temperatura y tiempo estipulados. Si se emplease un proceso de transformación con parámetros distintos a los fijados en el Reglamento, sería necesario que éste fuera aprobado por la autoridad competente para lo que, durante el periodo de un mes, se procedería a tomar muestras a diario del producto final, al que se realizarían los siguientes ensayos, de cara a validar el tratamiento:

a) a las muestras de material tomadas directamente después del tratamiento térmico:

*Clostridium perfringens* ausente en 1 g de los productos;

b) a las muestras de material tomadas durante el almacenamiento o en el momento de la salida del almacén en la planta de tratamiento:

*Salmonella*: Ausencia en 25 g:  $n = 5$ ,  $c = 0$ ,  $m = 0$ ,  $M = 0$

Enterobacteriaceae:  $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 10$ ,  $M = 300$  en 1 g

donde:

$n$ = número de muestras que deben analizarse,

$m$ = valor umbral del número de bacterias; el resultado se considera satisfactorio si el número de bacterias en todas las muestras no es superior a  $m$ ,

$M$ = valor máximo del número de bacterias; el resultado se considera insatisfactorio si el número de bacterias en una o más muestras es igual o superior a  $M$ , y

c= número de muestras cuyo contenido bacteriano puede estar entre m y M; la muestra se seguirá considerando aceptable si el contenido bacteriano de otras muestras es igual o inferior a m.

Además, el Reglamento indica que “Deberán registrarse y conservarse los datos sobre los puntos críticos de control en los que cada planta de tratamiento cumple satisfactoriamente las normas microbiológicas de modo que el propietario, el operador o su representante y la autoridad competente puedan seguir la operación de la planta de tratamiento. La información que debe registrarse y controlarse deberá incluir la dimensión de las partículas, la temperatura crítica y, si procede, el tiempo absoluto, el perfil de presión, la frecuencia de recarga de materia prima y el porcentaje de reciclaje de la grasa” y que dicha información deberá facilitarse a la Comisión cuando la solicite.

### **I-B Modificaciones del Reglamento**

En el año 2003 se publicó el siguiente Reglamento (CE) N° 808/2003 De la Comisión de 12 de mayo de 2003 por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo. En dicha modificación se establecen las nuevas normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano. Este nuevo Reglamento recoge una serie de modificaciones que afectan al uso de hidrolizados en consumo no humano. En concreto, es de interés para este trabajo el siguiente apartado

a) Las proteínas hidrolizadas deberán producirse mediante un proceso que incluya las medidas apropiadas para reducir al máximo la contaminación de la materia prima de la categoría 3. Las proteínas hidrolizadas tendrán un peso molecular inferior a 10 000 dalton.



## **I-C Situación actual**

Toda la normativa citada hasta el momento fue dictada tras la crisis alimentaria de principios de los años 90, debido al “mal de la vacas locas”, a partir de la cual, la Comisión Europea prohibió la utilización de harinas animales elaboradas en la alimentación de animales destinados para el consumo humano. Sin embargo, recientemente (tras la petición del ministro de agricultura polaco durante una reunión de ministros de agricultura celebrada en Bruselas el pasado 21 de febrero de 2011), el Parlamento Europeo (PE) publicó el 6 de julio de este año una propuesta relativa el levantamiento progresivo y sujeto a estrictas condiciones y garantías, de la prohibición de alimentar con harinas animales a las especies no rumiantes, como los cerdos y los pollos. Por tanto, se apoya la introducción de nuevo de la harina de carne y huesos, después de casi 10 años de prohibición. En dicho documento del PE se esgrimen dos aspectos principales a favor de la reintroducción del uso de estas harinas:

- a) los mayores costes de alimentación, originados por la subida de precios de los cereales y, especialmente, de la soja. La reintroducción de las proteínas animales procesadas en piensos para no rumiantes podría permitir a la UE disminuir su dependencia de otras fuentes de proteína. Actualmente, la proteína en las dietas de pollos y cerdos proviene, principalmente, de la harina de soja, cuyo precio se está incrementando debido a la mayor demanda internacional y la restricción europea sobre la importación de soja modificada genéticamente.
- b) la aparición de otros aspectos de mayor importancia y que más preocupan relacionados con la seguridad alimentaria (en contraposición con la reducción en encefalitis espongiformes bovina, el punto de mira está ahora focalizado en amenazas crecientes para la seguridad alimentaria, como la resistencia antimicrobiana y la

salmonella). Por tanto, se apunta hacia la necesidad de priorizar acciones hacia enfermedades que pueden tener un mayor impacto que la EEB en términos de salud pública.

De este modo, se habla del uso de harina de carne y de huesos en alimentación para no rumiantes, como porcino y aves, valorándose la posibilidad de levantar la prohibición sobre su introducción en estos piensos. Sin embargo, en el mismo documento, la CE aconseja que se mantenga la prohibición actual de administrar estas harinas procedentes de una especie a animales de la misma especie (canibalismo). Por tanto, si se llega a autorizar de nuevo el uso de harina de carne y huesos, ésta deberá ser procesada de forma segura, es decir, sin que haya posibilidad de contaminación cruzada con otras especies.

## II- LISTA DE REACTIVOS EMPLEADOS

2-b-mercaptoetanol

2-isopropanol

Aceite de semilla de algodón

Acetato sódico

Acetona

Acetonitrilo

Acido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico

Ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfónico monosódico

Ácido acético

Ácido clorhídrico

Ácido sulfúrico

Ácido tricloroacético

Ácido trifluoroacético

Acrilamida

Albúmina de huevo

Albúmina sérica bovina

Alcohol etílico

Anhidrasa carbónica

Apoproteína

Azul de bromofenol

Azul de comassie

Azul dextrano

Bicarbonato sódico

Bis-acrilamida

Borato potásico

Carbonato sódico

Catalasa

Citocromo c

Citrato trisódico

Cloroformo

Cloruro férrico

Cloruro sódico

Dextrano 10 kda  
Dodecil sulfato sódico  
Etilen diamino tetraacético  
Etilen diamino tetraacético- $fe^{2+}$   
Ferrocianida potásica  
Fosfato potásico dibásico  
Fosfato potásico monobásico  
Fosfato sódico dibásico  
Fosfato sódico monobásico  
Glicerol  
Glicina  
Hemoglobina  
Hidróxido sódico  
Lisozima  
L-lisina  
Metanol  
Miosina  
Ninhidrina  
Peróxido de hidrógeno  
Persulfato amónico  
Reactivo de folin  
Reactivo de nessler  
Safranina o  
Sulfato de cobre  
Sulfato sódico  
Sulfito sódico  
Tartrato sódico-potásico  
Tetrametiletildiamino  
Tris (hidroximetil) aminometano clorhidrato  
Trizma® ph=7.6  
B-galactosidasa