



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**



**MASTER INTERNACIONAL EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

– MITA –

“Efectos de los procesos de ultrafiltración y de hidrólisis  
enzimática sobre las propiedades funcionales del plasma bovino  
deshidratado”

**Autor: Germán Alejandro Simonetti**

**Directores: María Laura Matos y Hugo Daniel Chludil**

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**FACULTAD DE AGRONOMIA DE LA**

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

JUNIO DE 2016

# “Efectos de los procesos de ultrafiltración y de hidrólisis enzimática sobre las propiedades funcionales del plasma bovino deshidratado”

Lic: Germán Alejandro Simonetti

Gerencia de Proyectos Especiales, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

Directores:

Dra. María Laura Matos

Centro de Biotecnología Industrial, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).

Y

Dr. Hugo Daniel Chludil

Departamento de Biología Aplicada y Alimentos, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.

Este trabajo formó parte del Proyecto “Use of animal sub-products (blood and bones) for foodstuffs purposes” (2013-2015), en el marco del Centro Binacional Argentina-China en Alimentos, y fue financiado con fondos otorgados por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT, Argentina).

Parte de sus resultados fueron presentados en los siguientes eventos:

“Workshop on Plant and Animal Protein Processing”. Argentina-China Bilateral Center for Food Science and Technology, 18 y 19 de setiembre de 2014, MINCyT, Buenos Aires.

“Primera jornada sobre reducción, reutilización, reciclado y/o revalorización de residuos industriales”. 10 y 11 de junio de 2015, INTI, Sede Central.



“Sangue perfetto, che mai non si beve

Dall’assetate vene, e si rimane

Quasi alimento che di mensa leve,

Prende nel cuore a tutte membra umane

Virtute informativa, come quello

Ch’ a farsi quelle per le vene vane.”

**Dante Alighieri**

La Divina Comedia

Purgatorio, Canto XXV, v37-42

(“Sangre perfecta, que nunca beben  
las sedientas venas, y que sobra,  
como alimento que se saca de la mesa,

adquiere en el corazón de todos los miembros  
una virtud formante, como la sangre  
que a trocarse en ellos va por las venas.”)

Traducción de J. E. Sanguinetti

## Agradecimientos

- ~ A las autoridades del INTI, por invertir en mi capacitación en el área de alimentos con esta Maestría.
- ~ Al MINCYT, por el financiamiento de este trabajo. En particular, al Centro Binacional Argentina-China en Alimentos, en la figura de su Directora, la Dra. María Cristina Añón.
- ~ A las autoridades del Centro de Biotecnología Industrial del INTI, por autorizarme la cursada y la continuidad de los ensayos cuando dejé de pertenecer al mismo.
- ~ A mis Directores de Tesis, María Laura y Hugo, por su ayuda y su apoyo permanente.
- ~ A la Dra. Angélica Román Guerrero, del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, por su amabilísima ayuda y sus valiosas sugerencias.
- ~ A Andrés Kasimis y a María José Cutini, de “Ris-Bionutrición” y “Productos del Pilar”, por el suministro de la materia prima a estudiar y a “Novozymes”, por la donación de las enzimas utilizadas.
- ~ Al Ing. Agustín Correa, de SEGEMAR, por autorizarme el uso del secador por spray y a Elizabeth Cáceres, por su invaluable colaboración y ayuda.
- ~ A las autoridades de la Gerencia de Proyectos Especiales, en especial a Liliana Molina Tirado, por tenerme toda la paciencia para que terminara de escribir esta Tesis y alentarme siempre.
- ~ A todo el personal de INTI-Biotecnología Industrial, personal de Planta, Administrativos y de Mantenimiento que, más que compañeros de trabajo, fueron una parte de mí. Un agradecimiento extra a los que colaboraron directamente con las tareas de este proyecto. A Mariela Catone y Danilo Leguisa, que me ayudaron con la hidrólisis en el bendito biorreactor; a Hugo Amedei, Ezequiel Cancela, Paula Samter y Sara Reidel, por los infinitos análisis de Control de Calidad; a Joaquín Molina, por todas sus soluciones (de las preparadas y de las otras); a Daniel Kapitonozik, Graciela Tremulet y Adriana Achute, por todos sus lavados y su calidez; y muy, pero muy, especialmente a Laurita Toyé, por ayudarme y bancarme absolutamente en todo; sin ella no podría haber terminado esta Tesis. Gracias a todos por todo, pero especialmente por su cariño y respeto.
- ~ A Mir, Pancho y Reni, porque son todo.
- ~ A toda mi familia toda, a los que están y a los que no, pero sí.

# INDICE GENERAL

Resumen.....	1
<b>1 INTRODUCCION</b>	
1.1 Introducción General.....	3
1.1.1 Composición de la sangre.....	3
1.1.2 Usos de la sangre bovina.....	4
1.1.3 Obtención de la sangre bovina.....	5
1.1.4 Obtención de Plasma Deshidratado.....	6
1.2 Propiedades Funcionales de las Proteínas.....	7
1.2.1 Propiedades Reológicas.....	8
1.2.1.1 Solubilidad.....	8
1.2.1.2 Capacidad de Retención de Agua.....	10
1.2.1.3 Capacidad de Retención de Aceite o Grasa.....	11
1.2.2 Propiedades Surfactantes.....	12
1.2.2.1 Capacidad Emulsionante.....	12
1.2.2.2 Capacidad Espumante.....	15
1.2.3 Propiedades Biológicas.....	16
1.2.3.1 Capacidad Antioxidante.....	16
1.3 Desalado por Ultrafiltración.....	20
1.3.1 Necesidad de Remoción de iones.....	20
1.3.2 Principio de la Ultrafiltración.....	21
1.3.3 Descripción del Proceso Operativo.....	22
1.4 Hidrólisis enzimática.....	23
<b>2 OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivo General.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
2.2.1 Primera Parte.....	26
2.2.2 Segunda Parte.....	26

### 3 PRIMERA PARTE

#### **Obtención de Plasma Desmineralizado en polvo y evaluación de sus Propiedades Funcionales**

3.1	MATERIALES Y METODOS.....	28
3.1.1	Desmineralización del plasma por Ultrafiltración.....	28
3.1.1.1	Determinación de las condiciones operativas.....	28
3.1.1.2	Diafiltración del plasma.....	29
3.1.1.3	Deshidratación por secado por spray.....	30
3.1.1.4	Medición de Proteínas Totales.....	30
3.1.1.5	SDS-PAGE.....	31
3.1.2	Propiedades Funcionales.....	31
3.1.2.1	Solubilidad.....	31
3.1.2.2	Capacidad de Retención de Agua.....	32
3.1.2.3	Capacidad de Retención de Aceite.....	33
3.1.2.4	Capacidad Emulsionante.....	34
3.1.2.5	Capacidad Espumante.....	35
3.1.2.6	Capacidad Antioxidante.....	35
3.1.3	Análisis Estadístico.....	36
3.2	RESULTADOS Y DISCUSION DE LA PRIMERA PARTE	
3.2.1	Diafiltración del plasma.....	37
3.2.1.1	Determinación de las condiciones operativas.....	37
3.2.1.2	Diafiltración del plasma.....	40
3.2.2	Propiedades Funcionales.....	41
3.2.2.1	Solubilidad.....	41
3.2.2.2	Capacidad de Retención de Agua.....	43
3.2.2.3	Capacidad de Retención de Aceite.....	45
3.2.2.4	Propiedades Emulsionantes.....	46
3.2.2.5	Propiedades Espumantes.....	50
3.2.2.6	Capacidad Antioxidante.....	54
3.3	CONCLUSIONES DE LA PRIMERA PARTE.....	56

## 4 SEGUNDA PARTE

### **Obtención de hidrolizados enzimáticos de Plasma y evaluación de sus Propiedades Funcionales**

4.1	MATERIALES Y METODOS	
4.1.1	Selección de la enzima.....	58
4.1.2	Escalado en biorreactor.....	60
4.1.3	Medición de Proteínas Totales y Péptidos.....	62
4.1.4	Cromatografía de Exclusión Molecular.....	63
4.1.5	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	63
4.1.6	Evaluación de las Propiedades Funcionales.....	64
4.1.7	Fraccionamiento por Ultrafiltración.....	64
4.1.8	Análisis Estadístico.....	65
4.2	RESULTADOS Y DISCUSION DE LA SEGUNDA PARTE	
4.2.1	Selección de la enzima.....	66
4.2.2	Hidrolizados Enzimáticos.....	67
4.2.3	Evaluación de las Propiedades Funcionales.....	70
4.2.3.1	Solubilidad.....	70
4.2.3.2	Propiedades Emulsionantes.....	71
4.2.3.3	Propiedades Espumantes.....	72
4.2.3.4	Capacidad Antioxidante.....	73
4.2.4	Separación de las Fracciones por UF.....	75
4.3	CONCLUSIONES DE LA SEGUNDA PARTE.....	78
5	DISCUSION FINAL.....	79
6	REFERENCIAS.....	82

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Proceso de ultrafiltración.....	22
FIGURA 2: Sistema de UF en batch.....	23
FIGURA 3: Variación del flujo de Permeado en el tiempo.....	37
FIGURA 4: Variación del pH del Retenido y del Permeado.....	38
FIGURA 5: Conductividad del Retenido y del Permeado.....	38
FIGURA 6: SDS-PAGE de la diafiltración.....	39
FIGURA 7: Solubilidad del Plasma y Plasma Diafiltrado.....	41
FIGURA 8: CRAg del Plasma y del Plasma Diafiltrado.....	44
FIGURA 9: CRAC del Plasma y del Plasma Diafiltrado.....	45
FIGURA 10: Capacidad Emulsionante del Plasma y del Plasma Diafiltrado.....	46
FIGURA 11: Estabilidad Emulsionante del Plasma y del Plasma Diafiltrado.....	49
FIGURA 12: Capacidad Espumante del Plasma y del Plasma Diafiltrado.....	51
FIGURA 13: Estabilidad Espumante del Plasma y del Plasma Diafiltrado.....	52
FIGURA 14: Curvas de hidrólisis del Plasma con distintas enzimas.....	66
FIGURA 15: SDS-PAGE del Plasma y sus Hidrolizados.....	67
FIGURA 16: Proteínas Totales de los Hidrolizados.....	68
FIGURA 17: Péptidos libres de los Hidrolizados.....	68
FIGURA 18: Cromatogramas del Plasma y de sus Hidrolizados.....	69
FIGURA 19: Solubilidad del Plasma y de sus Hidrolizados.....	70
FIGURA 20: Capacidad Emulsionante del Plasma y de sus Hidrolizados.....	71
FIGURA 21: Estabilidad Emulsionante del Plasma y de sus Hidrolizados.....	71
FIGURA 22: Capacidad Espumante del Plasma y de sus Hidrolizados.....	72
FIGURA 23: Estabilidad Espumante del Plasma y de sus Hidrolizados.....	72
FIGURA 24: Capacidad Antioxidante (por DPPH) del Plasma y de sus Hidrolizados.....	74
FIGURA 25: Capacidad Antioxidante (por ABTS) del Plasma y de sus Hidrolizados.....	74
FIGURA 26: Cromatogramas de las Fracciones por UF del Hidrolizado 2.....	77



## INDICE DE TABLAS

TABLA 1: Especificaciones cartucho de UF Pellicon XL.....	28
TABLA 2: Especificaciones cartucho de UF Pellicon 2.....	29
TABLA 3: Proteínas totales del Proceso de UF.....	39
TABLA 4: Rendimiento del ensayo piloto de obtención de muestra.....	40
TABLA 5: Rendimiento del proceso de obtención de muestra.....	41
TABLA 6: CRAc del Plasma y del Plasma Diafiltrado.....	45
TABLA 7: Capacidad Antioxidante del Plasma Bovino Deshidratado.....	54
TABLA 8: Especificaciones de las enzimas utilizadas.....	58
TABLA 9: Condiciones ensayadas en las reacciones enzimáticas.....	59
TABLA 10: Concentración de proteínas totales y de péptidos de los Hidrolizados.....	68
TABLA 11: Capacidad Antioxidante de las Fracciones del Hidrolizado 2.....	76

## Resumen

En la Argentina la sangre obtenida del faenado del ganado bovino es considerada un subproducto de menor valor, a pesar de su alto contenido de proteínas de gran calidad. A diferencia de lo que ocurre en algunos países, en los cuales la sangre (o alguno de sus componentes) se utiliza como complemento alimenticio humano, en nuestro país sólo una pequeña fracción de la sangre recolectada es aprovechada, destinándola principalmente a consumo animal.

En este trabajo de Tesis se evaluó el potencial como aditivo alimentario humano del plasma bovino deshidratado, un derivado de la sangre bovina que se utiliza únicamente como complemento nutricional animal.

En la Primera Parte de este trabajo se obtuvo Plasma Desmineralizado mediante un proceso de diafiltración y se evaluaron algunas de sus propiedades funcionales (Solubilidad, Capacidad de Retención de Agua, capacidad de Retención de Aceite, Capacidad Emulsionante, Capacidad Espumante y Capacidad Antioxidante), comparándolas con las del plasma sin diafiltrar.

Como resultado de las tareas llevadas a cabo en esta Primera Parte, se lograron establecer las condiciones operativas para efectuar el proceso de diafiltración de manera eficaz y se pudo evaluar el efecto de dicho proceso sobre las Propiedades Funcionales del plasma consideradas.

La Solubilidad del plasma resultó alta en un amplio rango de pH, e incluso mejoró luego del proceso de diafiltración en algunos valores de pH. Los procesos realizados al plasma aumentaron su Capacidad de Retención de Agua; en cambio, su Capacidad de Retención de Aceite disminuyó. El plasma mostró una Capacidad Emulsionante acorde a lo descrito en la bibliografía; la diafiltración y la posterior deshidratación no la afectaron, pero sí aumentaron la estabilidad de las emulsiones formadas. El plasma mostró una gran capacidad para formar espumas estables, las cuales no resultaron afectadas por los procesos efectuados sobre el mismo. El plasma deshidratado original mostró una Capacidad Antioxidante similar a la descrita en la bibliografía. El efecto del proceso de diafiltración sobre la misma no pudo ser establecido.

En la Segunda Parte de este trabajo se obtuvieron dos hidrolizados enzimáticos a partir del plasma, utilizando la enzima Alcalase, con diferentes grados de hidrólisis. Se evaluaron las propiedades funcionales de los hidrolizados, comparándolas entre sí y con las del plasma original.

Como resultado de estas tareas se definieron las condiciones del proceso de hidrólisis, comprobándose la obtención de fragmentos proteicos y péptidos de distinto tamaño molecular.

Con respecto a las Propiedades Funcionales, los hidrolizados obtenidos resultaron ligeramente más solubles que el plasma deshidratado original, y la hidrólisis con Alcalase afectó notoriamente a las propiedades surfactantes de las proteínas plasmáticas, tanto a la Capacidad Emulsionante como a la Capacidad Espumante. En cambio, la hidrólisis enzimática aumentó marcadamente la Capacidad Antioxidante del plasma deshidratado. Los hidrolizados obtenidos presentaron una actividad de secuestro de radicales libres significativamente mayor que la del plasma original, y esa mayor actividad antioxidante resultó asociada al menor tamaño de los péptidos obtenidos.

En virtud de los resultados obtenidos, se concluye que el plasma bovino deshidratado, tanto en su forma original como desmineralizado, tiene potenciales aplicaciones como aditivo alimentario para mejorar algunas propiedades funcionales de los alimentos, y que los hidrolizados que se obtuvieron de él con la enzima Alcalase poseen una alta capacidad antioxidante, que los haría viables para ser utilizados como aditivos conservantes para prolongar la vida útil de los alimentos. De ser viable su uso en alimentos humanos, esto aumentaría el valor agregado de este subproducto de la industria cárnica.

Por último, se discuten algunas líneas de trabajo que deberían realizarse para completar su posible implementación en la industria alimenticia humana.

# 1 INTRODUCCION

## 1.1 Introducción General

Durante mucho tiempo en Argentina, la sangre obtenida del faenado del ganado fue considerada un subproducto de la industria cárnica de escaso valor y prácticamente se la desechaba, con excepción de una muy pequeña fracción destinada a la elaboración de algunos embutidos.

Hoy en día, la reglamentación y los controles estrictos sobre el tratamiento de efluentes impiden el vertido de la sangre sin tratar directamente al sistema de alcantarillado, al ser un residuo altamente contaminante por su elevada carga orgánica. Aproximadamente el 20 % de este desecho es materia sólida, de la cual un 80 % son proteínas (Madrid, 1999).

Como el tratamiento de la sangre para desecharla es costoso, a los establecimientos de faena les conviene contar con un sistema de recolección para la misma. Recolectar por separado la sangre permite, por un lado, reducir la carga orgánica contaminante que va al efluente y la cantidad de agua que se necesita para el proceso; por otro lado, la sangre colectada puede ser vendida como un subproducto con distintos usos potenciales. Del método utilizado para la recolección y, fundamentalmente, de las condiciones higiénicas en las que se realiza, dependerá también el destino que se le pueda dar a este subproducto.

Paradójicamente, mientras que para algunos el destino final de la sangre constituye un problema, para otros la sangre es considerada un recurso valioso, por la cantidad y calidad de sus componentes.

### 1.1.1 Composición de la sangre

La sangre está conformada por el plasma, un líquido rico en proteínas, en el cual están suspendidos los componentes corpusculares. Estos últimos son los glóbulos rojos (eritrocitos), con el pigmento hemoglobina que les otorga su color, los glóbulos blancos (leucocitos) y las plaquetas (trombocitos). Además de las sales (fosfato de

potasio, cloruro de sodio y cantidades menores de sales de calcio, hierro y magnesio), varias proteínas están presentes en la sangre, tales como albúminas y globulinas (6,5-8,5 %), fibrinógeno (0,3-0,4 %) y enzimas (Belitz et al., 2009).

Estos últimos componentes son los principales responsables de que, en contacto con el aire, la sangre coagule rápidamente. En la coagulación, el fibrinógeno soluble del plasma se convierte en fibras insolubles de fibrina, por la acción de la enzima trombina. Las largas fibras de fibrina se entrelazan tejiendo una malla que atrapa y retiene a los corpúsculos sanguíneos (plaquetas, eritrocitos y leucocitos), a partir de los cuales se forma el coágulo; el fluido remanente es el suero, que contiene mayoritariamente albúminas y globulinas (Belitz et al, 2009).

La coagulación requiere la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Por ese motivo, para evitar la coagulación durante los procesos de extracción y de separación de la sangre se utilizan generalmente agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , tales como citratos, fosfatos, oxalatos y fluoruros. La sangre estabilizada de esta manera, luego de centrifugada, aporta un 60-70 % de plasma, conteniendo un 7-8 % de proteínas (Prandl et al., 1994).

### 1.1.2 Usos de la sangre bovina

La sangre es una fuente muy rica de hierro y de proteínas de alta calidad funcional y nutricional.

En algunos países se utiliza como complemento alimenticio humano, siendo incorporada directamente a algunos alimentos, tanto la sangre entera como alguno de sus componentes separados (el plasma o la fracción roja) (Yousif et al., 2003; Ofori y Hsieh, 2012).

Sin embargo, en nuestro país esta práctica no se encuentra muy difundida, por distintas razones tales como desconocimiento de la calidad del recurso, desconfianza sobre los aspectos de higiene y salubridad, o falta de hábito, entre otras.

Sólo una pequeña porción de la sangre obtenida del faenado del ganado bovino es recuperada como subproducto de la industria cárnica y se destina, procesada en forma de harina, a alimentos balanceados para mascotas, cerdos, aves y piscicultura.

### 1.1.3 Obtención de la sangre bovina

El proceso de industrialización de la carne comienza en los mataderos-frigoríficos, establecimientos industriales en donde se sacrifican los animales y que poseen cámaras frigoríficas. Sus productos finales principales son las medias reses y las vísceras comestibles, siendo considerada la sangre un subproducto (Cervini, 2014).

El sacrificio consiste generalmente en un degüello manual, con el animal previamente aturdido, tras el cual existe un período de desangrado, que es seguido del desollado del animal (extracción del cuero), y las posteriores etapas de la faena para la obtención de las reses o medias-reses. Se estima que el total de sangre de un animal puede estimarse en un 7 % del peso vivo, del cual se obtiene un 4 %, permaneciendo el resto en el animal luego de las tareas de sacrificio y desangrado (Cervini, 2014).

El método empleado para el desangrado es de suma importancia para la calidad higiénico-sanitaria del producto obtenido, e influirá sobre su posible destino final. Existen diferentes métodos, pero los más utilizados son los tres siguientes (adaptado de Beltrán y Perdomo, 2007):

- El **desangrado vertical** es el método clásico, que permite recoger la sangre mientras el animal se va desplazando por la zona de desangrado del matadero colgado de sus patas traseras. La sangre va escurriendo directamente a una canaleta, ubicada debajo del animal, la cual sigue el riel de desangrado. De ahí, mediante una tubería, se envía al depósito de recepción.
- En el **desangrado horizontal**, el animal se coloca acostado sobre una cinta de transporte, en forma perpendicular a la misma, de forma tal que la zona donde se ha realizado el corte de desangrado queda separada del resto del animal, lo que permite recoger la sangre de una forma más higiénica que la anterior.

- El desangrado por una punción de la vena yugular con un cuchillo hueco al que se le ha acoplado un sistema de succión. El **cuchillo succionador** es, en principio, el método ideal para la recolección de la sangre en forma higiénica, ya que la sangre es bombeada directamente desde el animal a un depósito, sin sufrir contaminaciones intermedias. Sin embargo, presenta las desventajas de una baja eficiencia de extracción y de no adaptarse completamente a las altas velocidades de sacrificio de los mataderos, además de su alto costo.

#### 1.1.4 Obtención de Plasma Deshidratado

El plasma sanguíneo es la fracción líquida de la sangre sin los elementos celulares, pero que contiene fibrinógeno, el cual lo hace diferente del suero.

A medida que se va recolectando la sangre, se le va agregando un anticoagulante (normalmente, citrato sódico). Posteriormente se centrifuga para separa el plasma (un 60-70 % de la sangre original) de los corpúsculos celulares (Prandl et al., 1994).

El plasma luego es deshidratado por atomización por spray ("spray dryer"), que consiste en la pulverización del plasma en contracorriente con un flujo de aire caliente y seco. Si bien durante el proceso el aire se calienta a unos 170 °C, el plasma sólo alcanza temperaturas de entre 70 °C y 80 °C porque la evaporación del agua protege a las partículas, evitando su destrucción. Se obtiene así un producto en polvo, con un 94-96 % de sustancias sólidas, de las cuales más del 70 % son proteínas de alta calidad (Madrid, 1999).

En la Argentina, el plasma bovino deshidratado tiene dos aplicaciones principales: como complemento nutricional para la alimentación del ganado porcino y como aditivo en la industria de alimentos para mascotas. De acuerdo a sus fabricantes, como alimento para cerdos el plasma aporta nutrientes proteicos con gran cantidad de aminoácidos esenciales y un alto contenido de inmunoglobulinas, particularmente indicadas para animales de corta edad, posteriormente al destete. Como alimento para mascotas, el plasma utilizado como aditivo proporciona valor nutritivo de alta

digestibilidad; además, mejora el aspecto y la conservación de los productos, al mismo tiempo que incrementa su jugosidad y brillo (Nota técnica de Productos Pilar S.A.).

En aquellos países donde se utiliza la sangre en la industria alimenticia humana, el plasma es preferido por sobre la sangre entera debido a su sabor neutro y a la ausencia del color oscuro asociado a las células rojas sanguíneas (Ofori y Hsieh, 2012).

## 1.2 Propiedades Funcionales de las Proteínas

Las proteínas son ampliamente utilizadas como aditivos en muchos alimentos, ya que contribuyen a lograr o mejorar ciertas características deseadas para esos productos. Esas características pueden ser relativas al consumidor (por ejemplo, textura, apariencia, sensación en la boca, gusto) o relativas a la tecnología. Estas últimas incluyen tanto al almacenamiento (vida útil, palatabilidad), como al procesamiento (por ejemplo, comportamiento durante el mezclado, la formación de espuma, o la formación de emulsiones o de geles).

Las proteínas contribuyen a lograr una o varias de esas características gracias a sus **propiedades funcionales**. De acuerdo a Kinsella y Whitehead (1989), este término se usa principalmente para indicar las propiedades físico-químicas que gobiernan el desempeño y el comportamiento de una proteína en un sistema alimentario durante su preparación, procesamiento, almacenamiento y/o consumo. Como también se suele agregar proteínas a los alimentos para aumentar su calidad nutricional y, en algunos casos, para ejercer una determinada actividad fisiológica, las propiedades relevantes para cumplir con esas funciones también se consideran, en un sentido más amplio, como propiedades funcionales (Luyten et al., 2004).

Todas las proteínas están construidas por aminoácidos en una cierta secuencia, determinada por el ADN que las codifica, y con una estructura secundaria, terciaria y, algunas, hasta cuaternaria. Incluso, muchas proteínas sufren modificaciones post-traduccionales (glicosilaciones, fosforilaciones, procesos proteolíticos, etc.) antes de adquirir su forma nativa madura. Son su composición, su estructura espacial y su tamaño, los que determinan cómo la proteína actúa en un producto alimentario y cuál



es su función. Además, otra serie de variables pueden alterar la performance de una proteína en una matriz alimentaria, tales como factores extrínsecos (pH y temperatura), la presencia de otros componentes (sales, surfactantes, agua, etc.) y los tratamientos a los que fue sometida durante los procesos (incluidos los previos). Por lo tanto, la funcionalidad de una proteína depende, en gran medida, de las condiciones en las que se encuentra (Luyten et al., 2004).

### 1.2.1 Propiedades Reológicas

Se entiende por Reología al estudio de la deformación y del flujo de la materia (Bourne, 2002). En una dispersión proteica, la Reología considera aspectos relacionados con la viscosidad, la deformabilidad, la fuerza del gel, la fracturabilidad, etc. Este tipo de propiedades es importante para el comportamiento del alimento, tanto durante la ingesta, como así también durante su procesamiento y manipulación.

Las proteínas, al igual que otros polímeros, tienen la habilidad de espesar a los productos alimenticios, ya sea mediante el aumento de la viscosidad o produciendo un gel. De esta manera, incrementan la textura de los alimentos y, al mismo tiempo, les proveen cierta estabilidad y capacidad de retención de agua y de grasas.

El comportamiento de distintas proteínas puede ser muy diferente, debido principalmente a diferencias en el punto isoeléctrico, el peso molecular y el volumen que ocupan. Además, el comportamiento final depende no sólo de la proteína específica y de la cantidad presente de la misma, sino también de factores ambientales como son la temperatura, el pH del producto y la fuerza iónica de los componentes presentes. Uno de los factores más importantes en la determinación de las propiedades reológicas de una dispersión proteica es la solubilidad.

#### 1.2.1.1 Solubilidad

La solubilidad de una proteína frecuentemente es un prerrequisito para que sea funcional.

En términos teóricos, la solubilidad se define como la concentración de un compuesto puro en una solución saturada que contiene cristales. No obstante, por razones prácticas, esta condición rara vez se consigue en la determinación de la solubilidad de una proteína, lo que hace que la solubilidad sea una propiedad no bien definida y que dependa, en gran medida, del método utilizado para su determinación (Luyten et al., 2004).

En Química de los Alimentos se define la solubilidad, o extractabilidad, de las proteínas como el porcentaje de la cantidad total de proteína contenida en el material alimenticio que puede ser extraída con agua o con algún otro solvente adecuado, en condiciones especificadas. La solubilidad depende de las propiedades de la proteína y del solvente, y también del pH, de la concentración y de la carga de otros iones, de la relación masa de la muestra/volumen de solvente, del tamaño de partícula de la muestra y de la temperatura (Sikorski, 2007).

Generalmente, proteínas ricas en residuos ionizables, de baja hidrofobicidad superficial, son solubles en agua o en soluciones salinas diluidas. Por el contrario, proteínas abundantes en grupos hidrofóbicos suelen disolverse fácilmente en solventes orgánicos.

Un factor que puede disminuir la solubilidad es la desnaturalización de las proteínas, la cual deja más expuestos a los residuos hidrofóbicos que, en condiciones normales, estarían ocultos en el interior de la proteína plegada.

La solubilidad de una proteína depende también del número y de la disposición de los grupos polares y apolares a lo largo de la molécula. En soluciones acuosas, la solubilidad está también fuertemente influida por el pH. La solubilidad es mínima en el punto isoeléctrico; en ese valor de pH la carga eléctrica neta de la proteína es cero, por lo que no hay repulsión electrostática entre las moléculas y la lámina de hidratación por sí sola no puede impedir la agregación de las moléculas, por lo que éstas precipitan.

A valores de pH por debajo y por encima del punto isoeléctrico la solubilidad aumenta. Esto es debido a la repulsión entre sí de las cadenas polipeptídicas cargadas (positiva o

negativamente), y también al aumento de la interacción entre dichas cadenas cargadas con los dipolos del agua (Sikorski, 2007).

#### 1.2.1.2 Capacidad de Retención de Agua

La capacidad de retención de agua (CRAg) de un alimento se define como su habilidad para retener el agua, tanto la suya propia como la agregada, cuando se le aplican fuerzas, presiones, o procesos de centrifugación o calentamiento. En el caso de las proteínas, la capacidad de retención de agua es su habilidad para prevenir, física o fisicoquímicamente, que el agua se libere de su estructura tridimensional por acción de la gravedad (Zayas, 1997).

Muchas propiedades funcionales importantes de las proteínas en los alimentos están relacionadas con su interacción con el agua, tales como la solubilidad, la capacidad de hinchamiento, la viscosidad, y las propiedades de emulsión y gelación. La retención de agua suele ser una etapa preliminar en muchas operaciones de manufactura de alimentos y juega un rol principal en la formación de la textura, del color y de las cualidades organolépticas de los alimentos. Además, el contenido y la retención de agua también afectan la estabilidad de las proteínas alimenticias durante el almacenamiento de los productos (Sikorski, 2007).

Esta capacidad de las proteínas para retener humedad puede ser transferida a los alimentos procesados cuando se incorporan a ellos como aditivos. Como las capacidades de retención de agua y de hinchamiento varían entre las diferentes matrices proteicas, dichas capacidades deben ser evaluadas previamente, pues pueden afectar el orden en el que los ingredientes deben agregarse a la preparación. La mayoría de los aditivos con base proteica se comercializan deshidratados, en forma de polvo; en estos casos, la tasa de retención de agua puede ser utilizada para determinar si una proteína puede ser agregada como polvo o debe rehidratarse antes de su adición a la mezcla, ya que ingredientes proteicos con una CRAg excesivamente alta pueden llegar a deshidratar a otros componentes de la formulación (Zayas, 1997).

El mecanismo involucrado en la retención de agua por parte de las proteínas depende de la composición y de la conformación de las moléculas proteicas. El agua interactúa

con las proteínas de diferentes maneras, pero las uniones puente de hidrógeno juegan un papel significativo. Por un lado, hay que considerar la naturaleza dipolar de las moléculas de agua. Por el otro lado, las moléculas de agua forman uniones puente de hidrógeno con los grupos polares hidrofílicos de las cadenas polipeptídicas laterales, tales como los grupos imino, amino, carboxilo, oxhidrilo y sulfidrilo. La capacidad de las proteínas para retener humedad es influida por el tipo y el número de estos grupos en las cadenas polipeptídicas. Las proteínas que tengan numerosos aminoácidos cargados tenderán a unir una gran cantidad de agua. De esta manera, la Capacidad de Retención de Agua de una proteína podría predecirse a partir de su composición aminoacídica (Zayas, 1997).

#### 1.2.1.3 Capacidad de Retención de Aceite o Grasa

La absorción de aceite por las proteínas se puede definir como la cantidad de aceite retenido por unidad de masa proteica luego de someterlos a mezclado y centrifugación (Lin y Humbert, 1974, citados en Hijar Soltero (2013).

La importancia de la absorción de grasa o aceite por las proteínas en un sistema alimenticio reside tanto en el aporte energético y nutricional de los lípidos, cuanto en sus cualidades organolépticas y funcionales, en las cuales también intervienen los cambios que ocurren durante su procesamiento y las interacciones con otros componentes (Kolakowska y Sikorski, 2003; Pokorný y Kolakowska, 2003).

Con respecto al aspecto nutricional, el contenido lipídico de un alimento figura en la información nutricional del etiquetado como “grasas totales”, las cuales son una mezcla de varias clases de lípidos, principalmente diferentes triacilgliceroles, pero también esteroides, vitaminas y pigmentos que son cruciales para el metabolismo (Sikorski y Piotrowska, 2007).

En relación a las cualidades organolépticas y funcionales, la importancia de los lípidos reside fundamentalmente en la habilidad de las moléculas lipídicas tanto para modificar, y en algunos casos proveer, olores, sabores, y sensaciones placenteras en boca, cuanto para aumentar el transporte del flavor durante el procesamiento de los alimentos (Reineccius, 2006).

El mecanismo por el cual el aceite queda unido a las proteínas estaría relacionado con fuerzas capilares en hendiduras y cavidades de la superficie de las proteínas, que serían capaces de atrapar a las moléculas de aceite, y también con interacciones hidrofóbicas entre las regiones no polares de las cadenas polipeptídicas y las moléculas lipídicas (Pokorný y Kolakowska, 2003; Hajar Soltero, 2013).

### 1.2.2 Propiedades Surfactantes

A las proteínas se las suele utilizar en sistemas alimenticios para estabilizar la coexistencia de dos o más fases. Un ejemplo de esto son las espumas, que consisten en una fase de agua y una fase de burbujas de aire que espontáneamente tienden a separarse si no se agrega algún estabilizante.

De manera similar, en una emulsión alimenticia hay una fase de pequeñas gotas de aceite distribuidas en una fase acuosa; cuando no se agrega ningún estabilizador, las gotas de aceite terminan flotando juntas, formando una capa de aceite. El rol de las proteínas que actúan como surfactantes es prevenir el proceso de separación y retener las finas gotas de aceite o las burbujas de aire (Belitz et al., 2009).

Este efecto se consigue gracias a la naturaleza anfifílica de las proteínas que actúan en la superficie de la interfase: una parte de ellas es atraída hacia la fase polar hidrofílica (la solución acuosa) y otra parte de ellas es atraída hacia la fase no polar (el aire en una espuma o el aceite en una emulsión).

Varios procesos diferentes están involucrados en la preparación y en la estabilización de espumas y emulsiones. Cada proceso requiere de otras funcionalidades de los surfactantes, las cuales deben ser comprendidas para considerar los requerimientos que debe enfrentar una proteína (Belitz et al., 2009).

#### 1.2.2.1 Capacidad Emulsionante

Una emulsión es un sistema disperso formado por dos fases, una externa y una interna. Usualmente, esas fases están constituidas por dos líquidos inmiscibles entre sí. Cuando la fase externa es agua y la interna aceite, se considera un tipo de emulsión

“aceite en agua” (o/w, por las siglas en inglés). Cuando es a la inversa, es decir, agua dispersa en aceite, se trata de una emulsión “agua en aceite” (w/o). Algunos ejemplos de emulsiones alimenticias serían la leche (o/w), la manteca (w/o) y la mayonesa (o/w) (Belitz et al., 2009).

La apariencia a la vista de una emulsión depende del diámetro de las gotas de la fase interna, ya que este influye sobre la tasa de sedimentación de las mismas. Si el diámetro se encuentra en el rango de 0,15 – 100  $\mu\text{m}$ , la emulsión aparece como lechosa-túrbida. En cambio, las microemulsiones (diámetros entre 0,0015 y 0,15  $\mu\text{m}$ ) son transparentes y considerablemente más estables, porque la tasa de sedimentación es mucho más baja (Belitz et al., 2009).

Teniendo en cuenta cómo están formadas, las emulsiones resultan inestables. Por lo tanto, toda emulsión requiere un aporte de energía para su formación y algún agente emulsionante para retardar la desemulsificación (la cual puede darse por floculación, por coalescencia de las gotas o por inversión de las fases).

Los agentes emulsionantes son sustancias tensioactivas, cuya actividad está basada en su estructura molecular. Normalmente contienen una parte lipofílica o hidrofóbica, con buena solubilidad en la fase no acuosa (aceite o grasa), y una parte polar o hidrofílica, soluble en agua.

En un sistema inmiscible, tal como aceite/agua, el emulsionante se ubica en la interfase, en donde disminuye la tensión interfacial. De esta manera, incluso a muy bajas concentraciones, facilita una distribución fina de una fase dentro de la otra. El emulsionante también evita que las gotas, una vez formadas, se agreguen entre sí y coalezcan, formando una única gran gota.

Las proteínas son usadas ampliamente como agentes emulsionantes de grado alimenticio. Ellas ayudan a formar y a estabilizar las emulsiones, formando una película alrededor de las gotas de lípidos.

El efecto emulsionante de las proteínas se logra gracias a su acción en tres niveles diferentes.

En primer lugar, las proteínas permiten reducir el trabajo que se necesita para conseguir gotas más pequeñas cuando se agita la emulsión para su formación.

Esto puede verse en la Fórmula (1),

$$(1) \quad \mathbf{W = z \Delta A}$$

Según la cual, dicho trabajo (W) depende del incremento del área superficial de las gotas ( $\Delta A$ ) y de la tensión superficial (z). Disminuir el diámetro de las gotas aumenta el trabajo al aumentar el área interfacial, pero dicho trabajo puede reducirse bajando la tensión superficial, efecto que logran las proteínas al unirse a las gotas.

El segundo nivel en el que actúan las proteínas para favorecer las emulsiones es en prevenir el cremado por floculación. Las gotas de lípidos tienden a agregarse entre sí por acción de la fuerza gravitatoria, produciendo un rápido cremado. Las proteínas previenen la floculación al formar una película alrededor de los glóbulos lipídicos, la cual, por sus cargas electrostáticas e impedimentos estéricos, reduce el agregado de los mismos.

Este fenómeno se explica mediante la Fórmula (2)

$$(2) \quad \mathbf{V = 2 r^2 g \Delta P / 9 \mu}$$

Siendo: V = velocidad de la gota

g = fuerza gravitatoria

$\Delta P$  = diferencia de densidad de ambas fases

$\mu$  = viscosidad de la fase continua

r = radio de la gota o del agregado de gotas

Las películas estables que forman las proteínas alrededor de las gotas de grasa evitan que éstas se unan, con lo que el radio de las gotas permanece reducido y, por ende, su velocidad de caída resulta más baja.

Por último, el tercer nivel en el que las proteínas favorecen la estabilidad de las emulsiones es aumentando la viscosidad de la fase acuosa ( $\mu$ ), cosa que hacen las proteínas solubles, con lo que se reduce la movilidad de las gotas lipídicas ( $V$ ). La fórmula anterior también explica este efecto.

La cantidad de proteína requerida para estabilizar una emulsión en teoría aumenta con el volumen de la fase dispersa y con la disminución del diámetro de las gotas. Según estimaciones previas, para llegar a formar una capa monomolecular en la interfase de una emulsión se requiere una concentración efectiva de proteínas del rango de 0,5 a 20 mg/m<sup>2</sup> (Zikorski, 2007).

#### 1.2.2.2 Capacidad Espumante

Las proteínas funcionan como componentes formadores y estabilizadores de espuma en varios alimentos, tanto sólidos como líquidos, por ejemplo, en panificados, dulces, postres, cerveza, etc.

Estas propiedades varían de una proteína a otra y es muy común que las mezclas de varias proteínas sean las que mejor funcionan (Belitz et al., 2009).

Como ya se mencionó, las espumas son dispersiones de un gas (aire) en un líquido. La capacidad de formación de espuma de una proteína describe su habilidad para formar una película en la interfaz entre la solución y el aire, que debe ser lo suficientemente grande y estable como para contrarrestar las fuerzas internas y externas.

El proceso de formación de espuma por las proteínas ocurre de la siguiente manera. Una vez que las proteínas quedan adsorbidas en la interfase de la burbuja de aire se produce un desplegamiento parcial (denominado “desnaturalización superficial”). Las proteínas parcialmente desnaturalizadas se van asociando entre sí, mientras van formando las películas estabilizantes que recubren a las burbujas de aire. La reducción



de la tensión superficial, causada por la adsorción de las proteínas, facilita la formación de nuevas interfases y de más burbujas de aire (Belitz et al., 2009).

La capacidad espumante de una proteína depende, entonces, de tres factores principales: de su tasa de adsorción a la interfase, de su habilidad para formar una película cohesiva y de su flexibilidad molecular (esto es, la tasa a la cual se puede desplegar y sufrir rearrreglos moleculares para reducir la tensión superficial).

Por otra parte, si las proteínas presentan una estructura molecular muy rígida, la estabilidad de sus espumas se verá afectada, ya que la estabilidad de espuma depende de ciertas propiedades reológicas de las películas proteicas, tales como la viscosidad de la película, la resistencia a la rotura (“shear resistance”), y la elasticidad entre distintas capas de proteínas.

En última instancia, un balance adecuado entre flexibilidad y rigidez es el que producirá espumas estables. Factores externos, tales como pH, temperatura y la presencia de otros componentes (como azúcares, sales o lípidos), también afectan la capacidad de formar espumas y la estabilidad de las mismas (Hijar Soltero, 2013).

### 1.2.3 Propiedades Biológicas

#### 1.2.3.1 Capacidad Antioxidante

En la industria alimentaria, las proteínas y los aminoácidos se usan también como aditivos por su capacidad antioxidante, para prolongar la vida útil de los alimentos.

Todo alimento contiene una cierta cantidad de sustancias químicas, denominadas tradicionalmente “nutrientes”, que resultan necesarias para el mantenimiento, el crecimiento y la salud de los organismos. Los nutrientes aportados por la ingesta de diferentes fuentes alimentarias son procesados por el sistema digestivo del organismo y luego transportados hacia las células del cuerpo, en las que desarrollan sus funciones esenciales. En conjunto, las funciones llevadas a cabo por los nutrientes en las células aseguran una buena condición de salud, pero también juegan un papel importante en la prevención de enfermedades (Zamora et al., 2014).

El valor nutritivo de los alimentos no es constante, ya que se va deteriorando a través de varias reacciones de degradación, tanto durante la cocción de los alimentos como durante el almacenamiento de los mismos. Los principales procesos de deterioro son las reacciones de oxidación y la descomposición de los productos de oxidación (Pokorný, 2001).

Las fuentes de los procesos oxidativos son los radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno conocidas como ERO (o ROS, por su sigla en inglés por “reactive oxygen species”). Un radical libre es todo átomo o molécula que tenga, al menos, un electrón no apareado en su órbita más externa. A cualquier radical libre que contenga oxígeno se lo considera una ERO, pero la denominación ERO incluye también a especies que no son radicales libres (tales como peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ , oxígeno molecular  $O_2$ , ozono  $O_3$ , hipoclorito  $-OCl$ , y peroxinitrito  $ONOO^-$ ) (Kolakowska y Bartosz, 2014).

Todos los tipos de biomoléculas pueden ser dañadas por las ERO, pero algunas pueden ser oxidadas más fácilmente que otras. En el proceso de oxidación de un alimento, la oxidación lipídica desempeña un papel especial, debido a que el umbral energético para comenzar la peroxidación de los lípidos es menor que el requerido para iniciar la oxidación de proteínas, carbohidratos o ácidos nucleicos. Sin embargo, existe una interacción entre las reacciones oxidativas de varias biomoléculas. Los radicales libres de otras moléculas pueden iniciar la oxidación lipídica, mientras que productos de la oxidación lipídica pueden, por su parte, modificar a proteínas y ácidos nucleicos y consumir la cantidad disponible de antioxidantes (Kolakowska y Bartosz, 2014).

Por su parte, la oxidación de las proteínas cobra importancia en función de la abundancia relativa, generalmente alta, de estas biomoléculas en las matrices alimentarias. La oxidación proteica puede ocurrir tanto como resultado de un ataque directo de las ERO, como por fotooxidación o indirectamente a través de la peroxidación de lípidos que, adicionalmente, atacan y degradan proteínas (Kolakowska y Bartosz, 2014). Es interesante señalar que la oxidación de proteínas alimenticias es uno de los temas de investigación más innovadores dentro del campo de las ciencias de los alimentos, el cual está siendo estudiado desde hace solamente unos veinte años (Estévez, 2011).

La susceptibilidad a oxidarse de los lípidos y/o de las proteínas en un determinado alimento depende de varios factores, entre los que se pueden considerar: el contenido y la composición de lípidos y proteínas, la presencia de prooxidantes y antioxidantes, los niveles de oxígeno, la luz, la temperatura, y otros factores biológicos y tecnológicos (Kolakowska y Bartosz, 2014).

Las consecuencias de la oxidación de los componentes de un alimento son siempre perjudiciales para el mismo. Ya se mencionó a la disminución de su valor nutritivo como una de las consecuencias más importantes, a la que deben agregarse otros efectos que implican riesgos para la salud de los consumidores, como ser la formación de productos de oxidación tóxicos. También resultan de suma importancia los perjuicios sobre la calidad sensorial de los alimentos, ya que algunos procesos oxidativos pueden producir rancidez, malos olores, malos sabores y/o cambios en la coloración de los mismos, todo lo cual repercute en la aceptación o no de esos alimentos por parte de los consumidores (Zamora et al., 2014). En general se acepta que, aparte de la contaminación microbiana, la oxidación lipídica es el principal proceso responsable del deterioro de los alimentos, reduciendo su vida útil, su calidad nutricional y su salubridad (Kolakowska y Bartosz, 2014).

La oxidación puede ser inhibida por varios métodos, por ejemplo previniendo el acceso de oxígeno mediante envoltorios adecuados, usando bajas temperaturas, inactivando a las enzimas que catalizan la oxidación, o usando aditivos específicos. El nombre correcto de estos últimos es el de inhibidores de la oxidación, pero comúnmente se los denomina antioxidantes (Pokorný, 2001).

Se conocen varias sustancias con este efecto inhibitor de la oxidación, de distinta estructura química y con diferentes mecanismos de acción. El mecanismo más importante es la reacción con radicales libres lipídicos, con la formación de productos inactivos. Los aditivos con este mecanismo de acción son antioxidantes en su verdadero sentido. Generalmente, los antioxidantes reaccionan con radicales libres peroxi o alcoxi, formados por la descomposición de hidroperóxidos lipídicos.

Los antioxidantes se comenzaron a usar masivamente como aditivos preservantes de alimentos luego de la Segunda Guerra Mundial. Esos primeros antioxidantes fueron

sustancias naturales, las cuales fueron con el tiempo reemplazadas por sustancias sintéticas, más baratas, con mayor grado de pureza y con propiedades más uniformes. Entre los antioxidantes sintéticos más utilizados se encuentran el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT) y el galato propil (PG) (Peng et al., 2009).

Sin embargo, hoy en día el elevado uso de aditivos sintéticos está siendo cuestionado por los potenciales riesgos para la salud asociados con ellos, por lo que la preferencia de varios grupos de consumidores, se ha volcado hacia su reemplazo por sustancias más naturales, a las que consideran más aceptables como componentes de sus dietas. Los productores industriales de alimentos intentan satisfacer estas demandas de los consumidores, incorporando cada vez más antioxidantes naturales (Sarmadi y Ismail, 2010).

Entre los aditivos alimenticios que se utilizan como antioxidantes naturales se encuentran las proteínas, los péptidos y los aminoácidos, cuyas propiedades antioxidantes se conocen desde hace tiempo y son consideradas tan importantes como las de los polifenoles de las plantas, los tocoferoles y el ácido ascórbico (Ellias et al., 2008).

Las proteínas y los péptidos pueden actuar potencialmente como antioxidantes multifuncionales, que pueden inhibir varias vías diferentes de oxidación lipídica: inactivando especies reactivas de oxígeno, secuestrando radicales libres, quelando metales de transición prooxidativos, eliminando enzimáticamente especies oxidantes, y alterando las propiedades físicas de los sistemas alimentarios de forma tal que se separen las especies reactivas (Venskutonis, 2014).

En las últimas décadas se ha reportado una gran cantidad de péptidos activos con capacidad antioxidante, provenientes de fuentes alimenticias muy variadas (Sarmadi y Ismail, 2010; Samaranyaka y Li-Chan, 2011). Los péptidos caracterizados contienen entre 3 y 20 residuos aminoacídicos y usualmente su actividad está basada en su composición y secuencia de aminoácidos. Estas cadenas cortas de aminoácidos generalmente están inactivas dentro de la secuencia de sus proteínas de origen, y pueden ser liberadas durante la digestión gastrointestinal, el procesamiento de los

alimentos o por hidrólisis. En general, los péptidos muestran mayor capacidad antioxidante que las proteínas de las cuales derivan (Venskutonis, 2014).

El mecanismo exacto que subyace a la actividad antioxidante de los péptidos aún no está totalmente comprendido, pero muchos estudios muestran que los péptidos inhiben la peroxidación lipídica, secuestran radicales libres y quelan iones metálicos de transición. Los factores que parecen ser más importantes para la capacidad antioxidante de los hidrolizados proteicos que contienen péptidos son: el promedio de peso molecular, la composición de aminoácidos, la estructura, la hidrofobicidad, la posición de los aminoácidos en la secuencia peptídica y la conformación de los péptidos (Venskutonis, 2014).

Existen varios métodos para medir la actividad antioxidante de un compuesto. En los estudios con alimentos y sus componentes se usan generalmente dos tipos de ensayos: los asociados con la peroxidación lipídica y los asociados con el secuestro de electrones o de radicales libres. Los ensayos más comúnmente utilizados son los del segundo tipo, en la mayoría de los cuales se emplea un espectrofotómetro, lo que hace que resulten métodos rápidos y económicos.

La gran mayoría de los estudios sobre antioxidantes en alimentos se hace con el 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), el cual forma fácilmente un radical estable (DPPH\*), que acepta un hidrógeno de un antioxidante. La desaparición del DPPH\*, que es proporcional al efecto antioxidante, se monitorea con un espectrofotómetro a 517 nm. Otro de los ensayos más utilizados en alimentos es el del ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS), que se basa en la teoría que la decoloración del catión radical ABTS es causada por la acción de un antioxidante. La absorbancia de la reacción entre el ABTS y el antioxidante se lee en espectrofotómetro a 734 nm. Con ambos métodos, entonces, menores valores de absorbancia indican mayor capacidad antioxidante.

### 1.3 Desalado por Ultrafiltración

#### 1.3.1 Necesidad de Remoción de Iones

Las propiedades funcionales de las proteínas plasmáticas pueden ser modificadas mediante diferentes procesos. Algunos de estos procesos involucran la remoción de iones inorgánicos y sales propios de la sangre y de los agregados, tales como anticoagulantes (principalmente, citratos) (Dailoux et al., 2002; Del Hoyo et al., 2008). Más aún, la eliminación de algunos componentes minerales presentes en el plasma se torna imprescindible si este va a ser empleado como aditivo en alimentos dulces, como cremas heladas, tortas, panificados, etc., y muy especialmente para formulaciones alimenticias, particularmente dietas de pacientes hipertensos o renales (Rodríguez Furlán et al., 2011a).

Por otra parte, si se tiene la intención de aislar y purificar a las proteínas plasmáticas, la separación previa de estas impurezas facilitará el manejo del plasma y acelerará su purificación final (Del Hoyo et al., 2007).

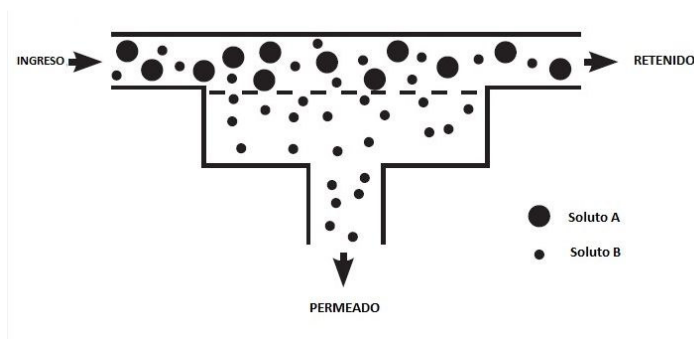
Entre las técnicas más utilizadas para remover compuestos inorgánicos del plasma sanguíneo se encuentran el intercambio iónico, la filtración en gel y la ultrafiltración con membranas (Fernando, 1981). De éstas, la ultrafiltración se ha difundido más que las otras porque es un proceso muy simple, con requerimientos energéticos muy bajos, no perjudica la calidad de los solutos y, finalmente, pueden efectuarse en forma simultánea la separación y la concentración de las proteínas. Por todas estas razones, la ultrafiltración es considerada una “tecnología limpia” (Torres et al., 2002). Otra de las razones de la adopción de esta técnica a nivel industrial es la gran facilidad para su escalado (Wan et al., 2006).

### 1.3.2 Principio de la Ultrafiltración

La Ultrafiltración (UF) es un proceso de separación por una membrana, impulsado por presión. Dicho proceso se basa en el tamaño y la forma de los componentes de la mezcla a separar, ya que las membranas que se utilizan poseen poros con un tamaño tal que permiten el pasaje de materiales solubles y de bajo peso molecular, mientras que las partículas o moléculas más grandes que el tamaño de los poros quedan

retenidas. Se considera ultrafiltración cuando el tamaño de los poros de la membrana se encuentra en el rango de 0,01-0,001  $\mu\text{m}$  (Evans et al., 2009).

Usualmente la ultrafiltración se efectúa con un sistema de filtración tangencial, en el cual la mezcla a separar se bombea en forma tangencial a la superficie de la membrana. El gradiente de presión que existe a través de la membrana genera el empuje de los solutos (los materiales pequeños disueltos y el agua) a través de los poros de la membrana. La fracción filtrada que atraviesa la membrana se denomina “permeado”, pues la membrana es permeable a ella, mientras que la fracción de la mezcla que no puede atravesar la membrana es llamada “retenido” o “concentrado”. La FIGURA 1 ilustra los conceptos básicos de la Filtración Tangencial.



**FIGURA 1:** Proceso de ultrafiltración

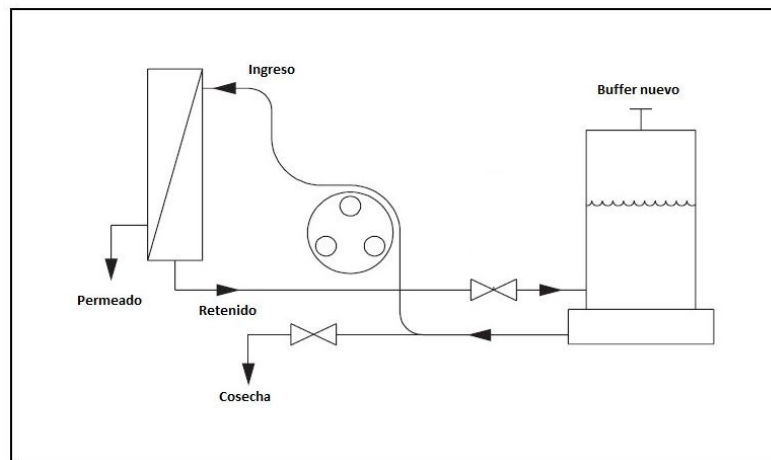
(Figura adaptada de Millipore Corporation, 1997)

### 1.3.3 Descripción del Proceso Operativo

En un proceso de operación en “batch”, la muestra almacenada en un reservorio es impulsada por una bomba de velocidad variable hacia un cartucho que contiene a la membrana. La fracción retenida regresa nuevamente al reservorio y queda recirculando en el sistema, mientras que la fracción permeada es colectada en otro recipiente o descartada, según se requiera. En la FIGURA 2 se esquematiza un sistema de este tipo.

A medida que la operación continúa, el volumen de la muestra va disminuyendo y los solutos de alto peso molecular se van concentrando. La presión del sistema, que

provee la fuerza para la filtración, es regulada por el control de la velocidad de la bomba y por una válvula de contrapresión en la línea de retorno.



**FIGURA 2:** Sistema de UF en batch

(Figura adaptada de Millipore Corporation, 1997)

Cuando se utiliza un sistema como el descrito para un desalado o para un cambio de buffer se agrega agua o buffer a la muestra en forma continua, a una tasa igual a la tasa de remoción del permeado. De esta manera, el volumen de la muestra circulante se mantiene constante, mientras son removidos los componentes de bajo peso molecular. Este proceso es conocido como “Diafiltración” (Millipore Corporation, 1997).

#### 1.4 Hidrólisis enzimática

Para intentar mejorar las propiedades funcionales de las proteínas se han empleado diferentes métodos, tanto físicos como químicos y enzimáticos, que cambian la estructura proteica (Panyam y Kilara, 1996; Severin y Xia, 2006; Wang et al., 2006; Yu et al., 2007).

Una de las modificaciones más utilizada es la hidrólisis, que consiste en la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas, para dar lugar a la formación de cadenas polipeptídicas de menor tamaño, péptidos y hasta aminoácidos libres. La hidrólisis



puede ser química (ácida o alcalina), o enzimática (mediante enzimas específicas llamadas proteasas). En cualquiera de los dos casos, es altamente deseable que los productos generados conserven sus propiedades funcionales y nutricionales, por lo que los procesos de hidrólisis deben ser cuidadosamente controlados.

En ese sentido, las hidrólisis químicas tienden a ser difíciles de controlar y producen modificaciones en algunos aminoácidos. Por ejemplo, la hidrólisis ácida convencional, con ácido clorhídrico 6 M a 110 °C, puede destruir al triptofano, mientras que la hidrólisis alcalina puede reducir el contenido de cistina, arginina, treonina, serina, isoleucina y/o lisina, y formar residuos de aminoácidos poco usuales como lisinoalanina o lantionina (Tavano, 2013).

En cambio, las hidrólisis enzimáticas pueden llevarse a cabo bajo condiciones mucho más suaves y en ambientes menos extremos que los requeridos por los tratamientos químicos. Usualmente, los procesos enzimáticos tienen una mínima formación de productos secundarios no deseados y no disminuyen el valor nutricional de las moléculas logradas. Además, las enzimas poseen especificidad de sustrato, lo que permite el desarrollo de hidrolizados proteicos con características funcionales y nutricionales mejor definidas (Liu et al., 2010; Yust et al., 2010; Banach et al., 2013, Tavano, 2013).

Como la esencia de una hidrólisis enzimática es la rotura del enlace peptídico y, en consecuencia, la generación de péptidos de menor tamaño, no es de extrañar que la propiedad fundamental de un hidrolizado sea su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original (Adler-Nissen, 1979; Diniz y Martin, 1997; Millán et al., 2002).

Un proceso de hidrólisis puede modificar las propiedades funcionales de las proteínas, al cambiarles el tamaño molecular, la conformación y la fuerza de las uniones inter e intramoleculares. (Panyam y Kilara, 1996; Guan et al., 2007). El resultado final sobre las propiedades funcionales dependerá del grado de hidrólisis alcanzado y de la propiedad funcional en cuestión. Por lo tanto, la reacción de proteólisis debe ser cuidadosamente monitoreada y controlada para obtener productos con la funcionalidad deseada (McNairney, 1984).

De acuerdo a Millán et al. (2002), el grado y tipo de hidrólisis van a determinar el resto de las propiedades del hidrolizado y, en última instancia, el uso que se le dará al mismo. Siguiendo a estos autores, los hidrolizados que se producen para su uso en alimentación se pueden dividir en tres grupos: hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre un 1 % y un 10 %, para la mejora de las propiedades funcionales; hidrolizados con grado de hidrólisis variable para su uso como “flavorizantes”; y por último, hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 15 %, para su uso en alimentación especializada, como suplemento proteico o en dietas médicas.

Para lograr un mejoramiento aceptable de las propiedades funcionales, en relación a las mostradas por las proteínas originales, generalmente se admite que es necesaria una hidrólisis limitada, entre el 1 % y el 10 %, dependiendo del sustrato y de la enzima utilizada (Yust et al., 2010; Tavano, 2013).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo es evaluar el potencial como aditivo alimentario humano del plasma bovino deshidratado, un subproducto de la industria cárnica destinado hoy en día únicamente a alimentación animal, con vistas a aumentar su valor agregado.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### 2.2.1 Primera Parte

- Evaluar las Propiedades Funcionales del plasma bovino deshidratado.
- Obtener plasma desmineralizado mediante el proceso de diafiltración.
- Determinar las Propiedades Funcionales del plasma diafiltrado y compararlas con las del plasma original.

#### 2.2.2 Segunda Parte

- Obtener hidrolizados enzimáticos de plasma bovino deshidratado con diferentes grados de hidrólisis.
- Evaluar las Propiedades Funcionales de los hidrolizados obtenidos, comparándolos entre sí.

Obtención de Plasma Desmineralizado  
en polvo y evaluación de sus  
Propiedades Funcionales.

## 3.1 – Materiales y Métodos de la Primera Parte

### 3.1.1 Desmineralización del plasma por Ultrafiltración

#### 3.1.1.1 Determinación de las condiciones operativas

Con el fin de desmineralizar el plasma por diafiltración se realizó un ensayo preliminar, para comprobar la eficacia del proceso y determinar los parámetros operativos.

Para este ensayo se utilizó un cartucho para filtración tangencial Pellicon XL (Millipore, EUA) de 50 cm<sup>2</sup> de área efectiva, junto con una bomba peristáltica Masterflex L/S (Cole Parmer, EUA) a un flujo de 6 ml/min.

Como las principales proteínas plasmáticas poseen un peso molecular mayor a 30 kDa, se eligió una membrana con un tamaño nominal de poro de 5 kDa, para permitir el pasaje de los iones inorgánicos (solución de permeado) y retener efectivamente a las proteínas.

Las especificaciones del cartucho Pellicon XL se muestran en la TABLA 1:

<b>TABLA 1: Especificaciones cartucho de UF Pellicon XL</b>	
Materiales de construcción:	
Membrana	Polietersulfona (PES)
Carcasa	Polipropileno
Área de Filtración:	50 cm <sup>2</sup>
Dimensiones:	3,0 cm x 18,8 cm
Volumen de hold-up	3,2 ml
Presión operativa máxima:	2,7 bar (40 psi)
Compatibilidad de pH:	1-14

Se prepararon 50 ml de una dispersión de plasma bovino deshidratado (Productos Pilar S.A., Argentina) al 3 % en agua purificada, la cual se centrifugó a 10.000 g durante 30 min para eliminar el material no solubilizado (centrífuga HERMLE Z236HK, Alemania).

El sobrenadante obtenido se filtró con papel de filtro y se lo ingresó al sistema de ultrafiltración, con el cual se lo concentró a un volumen de 25 ml y luego se lo diafiltró

contra 10 diavolumenes de agua purificada, de manera discontinua, a temperatura ambiente (24 °C).

En cada diavolumen agregado se midieron el pH y la conductividad del retenido y del permeado, así como el flujo de permeado.

Se tomaron muestras al inicio y al final del proceso para determinar la cantidad de proteínas totales y el perfil proteico.

### 3.1.1.2 Diafiltración del plasma

Se utilizó un sistema de Filtración Tangencial ProFlux M12 (Millipore, EUA), provisto con un tanque reservorio de 3 L de capacidad y sensor de nivel, una bomba peristáltica principal de 1/3 HP, transductores de presión con error estático de +/- 0,5 % FS, tubuladuras sanitarias (Pharmed 65) de 3/8" y 1/2" y conexiones de tipo mini-clamp.

Se empleó una membrana Pellicon-2 (Millipore) de tamaño de poro nominal de 5 kDa, con las especificaciones detalladas en la TABLA 2:

<b>TABLA 2: Especificaciones cartucho de UF Pellicon 2</b>	
Materiales de construcción:	
Membrana	Celulosa regenerada
Carcasa	Polipropileno
Área de Filtración:	0,5 m <sup>2</sup>
Dimensiones:	21 cm x 17,8 cm x 1,3 cm
Volumen de hold-up	90 ml (llena), 5 ml (vacía)
Presión operativa máxima:	7 bar (100 psi)
Compatibilidad de pH:	1-14

Se prepararon 40 g de plasma bovino deshidratado (Productos Pilar S.A., Argentina) en una dispersión al 3 % (p/v) con agua purificada, a 30 °C. Luego de centrifugar (30 min a 10.000 g), el sobrenadante obtenido se filtró con filtro de papel y se ingresó al sistema de TFF. El precipitado se secó en estufa a 55 °C (overnight) y se pesó para calcular el rendimiento. Los 1.350 ml del sobrenadante se concentraron a 500 ml y se diafiltraron

contra 7 diavolumenes de agua purificada, trabajando en sistema de batch. La solución final cosechada se conservó a 4 °C hasta su secado por spray.

Luego del proceso, el sistema se enjuagó con agua purificada y se sanitizó con NaOH 0,5 M. Se efectuó el test de Permeabilidad Normal al Agua (NWP) para comprobar la eficacia de la sanitización y se verificó la integridad de la membrana mediante el test de difusión con un equipo Sartocheck 3 (Sartorius, Alemania).

### 3.1.1.3 Deshidratación por secado por spray

El plasma diafiltrado se deshidrató con un secador por spray de laboratorio Mini Spray Dryer B-290 (Büchi, Suiza), cuyos parámetros se fijaron en los siguientes valores:

T Inlet	216 °C
T Outlet	129 °C
Aspiration	70 %
Pump	15 %

El producto obtenido se recolectó en su totalidad y se pesó para calcular el rendimiento del proceso. Sobre el mismo también se determinaron proteínas totales y perfil proteico.

### 3.1.1.4 Medición de Proteínas Totales

La cantidad de proteínas totales presente en las distintas muestras se valoró cuantitativamente mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951), cuyo fundamento es la formación de un complejo coloreado entre los residuos fenólicos de las proteínas y el reactivo de Folin-Ciocalteu, siendo la intensidad del color formado proporcional a la concentración de proteínas.

Para eliminar la posible interferencia de los compuestos no proteicos se hizo precipitar a las proteínas con ácido tricloroacético; los sobrenadantes resultantes (conteniendo a los compuestos interferentes) fueron descartados y los precipitados (conteniendo a las proteínas) fueron resuspendidos en agua destilada. Por último, se procedió a

centrifugar las dispersiones así preparadas, utilizando solamente a los sobrenadantes obtenidos para la reacción de color (Bensadoun y Weinstein, 1976).

Todas las reacciones se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos, confeccionando una curva de calibración con albúmina bovina sérica (BSA, Sigma) en cada una de las placas utilizadas. Todas las muestras y todos los puntos de la curva patrón fueron ensayados por triplicado, y se estableció como criterio de aceptación para el ensayo un Coeficiente de Variación (CV) para cada triplicado menor al 15 %.

Las reacciones se midieron colorimétricamente a 690 nm en lector de placas Elisa (Tecan Sunrise-Basic, Suiza).

#### 3.1.1.5 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para observar el perfil proteico de las muestras se realizó un SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y reductoras, de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Se utilizó una cuba vertical MiniProtean III (Bio-Rad, EUA), provista de una fuente Powerpac Basic (Bio-Rad, EUA).

El gel se preparó con una concentración de poliacrilamida del 10 % y se corrió a 100 V durante 134 min. Las muestras se sembraron en una concentración aproximada de 10 µg de proteína por calle, junto con marcadores de peso molecular de rango amplio (Bio-Rad, EUA). La tinción se realizó con Coomassie Blue Coloidal.

### 3.1.2 Propiedades Funcionales

#### 3.1.2.1 Solubilidad

Para determinar la solubilidad de las proteínas de las muestras se utilizó el método de Klompong et al. (2007), con ligeras modificaciones.

Con cada muestra se preparó una dispersión al 1 % (p/v) en agua purificada y se llevó a pH con HCl 0,5 M o NaOH 0,5 M, según correspondiese.



Las muestras así preparadas se repartieron en tubos Eppendorf de 1,5 ml, cada valor de pH por triplicado. Luego de ser agitadas a temperatura ambiente durante 30 minutos, las muestras fueron centrifugadas a 10.000 g durante 30 minutos, a 5 °C, en ultracentrífuga (HERMLE Z-233MK-2, Alemania).

El contenido de proteínas totales obtenido en la dispersión original y en los sobrenadantes se determinó por espectrofotometría. Para ello se utilizó un espectrofotómetro (BOECO S-30, Alemania) en modo de medición de proteínas por UV, el cual estima la concentración proteica midiendo la absorbancia a 280 nm y a 260 nm, y aplicando la fórmula:  $PT = A_{280} \times 1,55 - A_{260} \times 0,76$  (según Aitken y Learmonth, 2009).

La solubilidad proteica se calculó como:

$$\text{Solubilidad (\%)} = (A / B) \times 100$$

Donde A es el contenido proteico en el sobrenadante y B es el contenido proteico en la muestra inicial.

### 3.1.2.2 Capacidad de Retención de Agua (CRAg)

Para evaluar la capacidad de retención de agua se utilizó el método de Yu et al. (2007), con ligeras modificaciones. Para cada valor de pH se preparó una dispersión al 5% (p/v) de la muestra en agua destilada y se llevó a pH con HCl 0,5 M o NaOH 0,5 M, según correspondiese. Las muestras así preparadas se colocaron en tubos Eppendorff de 1,5 ml, previamente tarados, se dejaron en reposo durante una hora a temperatura ambiente y luego se centrifugaron durante 30 min a 10.000 g en ultracentrífuga (HERMLE Z-233MK-2, Alemania).

Los sobrenadantes se descartaron y los tubos con los precipitados húmedos se pesaron en balanza de precisión (SARTORIUS CPA 2245, Alemania, sensibilidad=0,1 mg). Posteriormente, dichos tubos se secaron a 105 °C en estufa (BINDER 400, Alemania)

durante toda una noche y se volvieron a pesar con su correspondiente masa seca. Todas las muestras se ensayaron por triplicado.

La Capacidad de Retención de Agua se calculó como:

$$\text{CRAg} = (w_1 - w_2) / (w_2 - w_0)$$

Donde:  $w_0$ : peso del tubo

$w_1$ : peso del tubo con la masa húmeda

$w_2$ : peso del tubo con la masa seca

La CRAg se expresó como gramo de agua retenida por gramo de producto.

### 3.1.2.3 Capacidad de Retención de Aceite (CRAc)

Se determinó por el método de Shahidi et al. (1995), con modificaciones. Cada ensayo se realizó por quintuplicado. A cada uno de 5 tubos Eppendorf de 2 ml, previamente tarados, se les colocó 150 mg de muestra y luego se le agregó 1 ml de aceite de maíz. Todos los tubos se agitaron en Vortex, a velocidad máxima durante 1 minuto y luego se centrifugaron durante 30 minutos a 10.000 g, en ultracentrífuga (HERMLE Z-233MK-2, Alemania). Posteriormente, se decantó el aceite libre y pesaron los tubos con sus precipitados en una balanza de precisión (SARTORIUS CPA 2245, Alemania, sensibilidad = 0,1 mg).

La Capacidad de Retención de Aceite se calculó como:

$$\text{CRAc} = (w_1 - w_0 - m) / m$$

Donde:  $w_0$  : peso del tubo vacío

$w_1$ : peso del tubo con el pellet

m: masa del producto

El resultado se expresó como gramos de aceite absorbido por gramo de producto.

#### 3.1.2.4 Capacidad Emulsionante

Se utilizó el método descrito en Naczk et al. (1985) con modificaciones propuestas por Román Guerrero (comunicación personal, 2015).

Una dispersión al 0,2 % de la muestra en agua purificada fue llevada a pH con HCl 0,5 M o NaOH 0,5 M, según correspondiese (valores de pH: 4, 6, 8 y 10).

Posteriormente, con cada muestra se siguió el procedimiento que se detalla a continuación, realizando los ensayos por triplicado: 3 ml de solución se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml, a los que se les fue agregando 1 ml de aceite de maíz, gota a gota mediante una bomba peristáltica, mientras se agitaba con homogeneizador Ultra Turrax (IKA T-10 Basic, Alemania), a la velocidad más baja permitida por el equipo. Una vez adicionado todo el volumen de aceite, la emulsión se conseguía aumentando la velocidad del agitador a 20.000 rpm, durante un minuto, trabajando en baño con hielo.

Una vez formada la emulsión, se la dejaba reposar por 30 min y luego se medía el volumen ocupado por la misma dentro del tubo.

La Actividad Emulsionante se calculó como:

$$AE (\%) = (\text{Volumen de la fase emulsionada} / \text{volumen total}) \times 100$$

Para evaluar la estabilidad de cada emulsión conseguida se dejaron todos los tubos con las emulsiones en reposo, a temperatura ambiente (24 °C) durante un período de 7 días, luego del cual se volvió a medir el volumen ocupado por la emulsión.

La Estabilidad de la Emulsión se calculó como:

$$EE (\%) = (AE_f / AE_i) \times 100$$

Siendo  $AE_i$  la Actividad Emulsionante inicial y  $AE_f$  la Actividad Emulsionante final (a los 7 días).

### 3.1.2.5 Capacidad Espumante

Se utilizó el método de Lawhon et al. (1972), con modificaciones. Se preparó una dispersión al 1 % de la muestra, la cual se repartió en alícuotas que fueron llevadas a los valores deseados de pH de manera similar a la realizada para los ensayos anteriores.

De cada muestra así preparada se tomaron 10 ml, que se colocaron en una probeta plástica de 25 ml. Se tapó la probeta herméticamente y se agitó vigorosamente durante treinta segundos, luego de los cuales se midió el volumen de espuma logrado. Dicho volumen se volvió a medir luego de sesenta minutos, para calcular la estabilidad de la espuma.

La Capacidad Espumante (CEs) se estimó como:

$$\text{CEs (\%)} = \{(\text{Volumen Total Final} - \text{Volumen Inicial}) / \text{Volumen Inicial}\} \times 100$$

La Estabilidad de la Espuma (EEs) se calculó como el porcentaje de espuma remanente después de sesenta minutos.

### 3.1.2.6 Capacidad Antioxidante

Para evaluar la actividad de secuestro del radical DPPH se utilizó el método explicado en el trabajo de Shimada y col. (Shimada et al., 1992), con modificaciones. Doscientos microlitros de solución muestra se mezclaron con 800  $\mu\text{l}$  de una solución 1 mM de reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) en metanol, preparado en el día. La solución resultante se dejó en reposo durante 30 min, antes de ser medida espectrofotométricamente a 517 nm.

La actividad antioxidante se calculó como porcentaje de inhibición, según la fórmula

(1):

$$(1) \quad \% I = (A_{517} \text{ Blanco} - A_{517} \text{ Muestra} / A_{517} \text{ Blanco}) \times 100$$

Como Blanco se utilizó la solución preparada del reactivo DPPH, con agua destilada en lugar de la muestra.

La actividad secuestrante de radicales ABTS se determinó con el método descrito por Thiansilakul et al. (2007), con modificaciones. Se preparó una solución de trabajo agregando 88 µl de una solución 140 mM de persulfato de potasio a 5 ml de una solución 7 mM de ABTS (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). La misma se guardó en lugar oscuro hasta el día siguiente, y luego se realizó una dilución en metanol (1:88).

Para las reacciones se utilizaron 5 µl de muestra en 2.995 µl de la solución de ABTS. Las mezclas así preparadas se dejaron en reposo, en oscuridad, durante quince minutos y luego se leyeron en espectrofotómetro a 730 nm.

La actividad antioxidante se calculó como porcentaje de inhibición, de acuerdo a la fórmula (2):

$$(2) \quad \% I = (A_{730} \text{ Blanco} - A_{730} \text{ Muestra} / A_{730} \text{ Blanco}) \times 100$$

Como Blanco se utilizó la solución preparada del reactivo ABTS, con 5 µl de agua destilada en lugar de la muestra.

### 3.1.3 Análisis Estadístico

Todos los ensayos de evaluación de las propiedades funcionales se llevaron a cabo por triplicado, con excepción de los de Capacidad de Retención de Aceite, que se realizaron por quintuplicado. Los datos fueron analizados usando el programa Statistica 8.0 (Stat Soft, Inc.). La significancia de los efectos principales se determinó mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA) de uno o de dos factores, según correspondiese al ensayo. La validez para aplicar este análisis se estableció previamente mediante el test de Levene (homocedacia) y graficando la distribución de los residuos (normalidad). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las medias se identificaron mediante el test de comparaciones múltiples a posteriori de Duncan.

## 3.2 - Resultados y Discusión de la Primera Parte

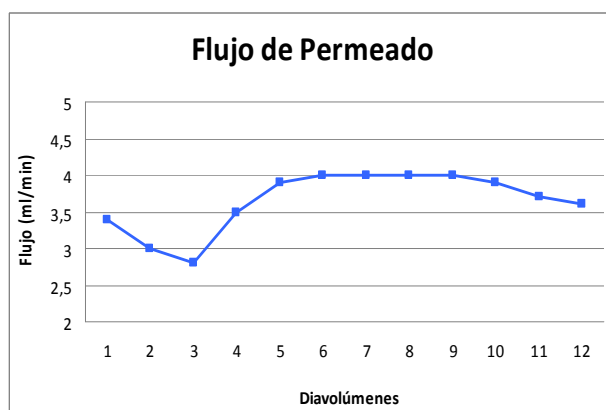
### 3.2.1 Diafiltración del plasma

#### 3.2.1.1 Determinación de las condiciones operativas

Como se mencionó previamente, se realizó un ensayo de diafiltración a baja escala para determinar las condiciones operativas óptimas para el procesamiento del plasma.

La eficacia del proceso se evaluó mediante el estudio del comportamiento de la membrana frente a la matriz ensayada, así como de las características de las distintas fracciones obtenidas durante la diafiltración. También se consideró el rendimiento del proceso en términos cuali/cuantitativos respecto de la matriz inicial.

En primer lugar, se observó que el comportamiento de la membrana resultó de acuerdo a lo esperado para este tipo de procesos. En la FIGURA 3 se puede observar la variación del flujo de permeado a lo largo del tiempo que duró el ensayo (considerado como diavolumenes de buffer utilizados).

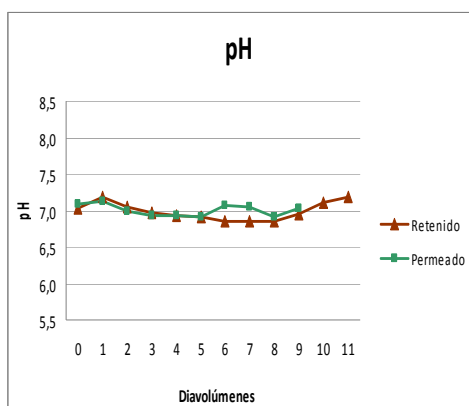


**FIGURA 3:** Variación del flujo de permeado

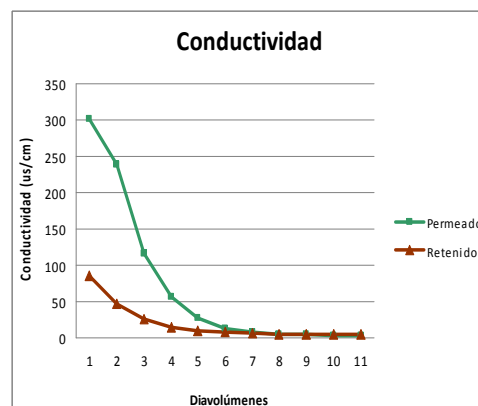
Al comienzo de la misma el flujo decae levemente, lo cual es atribuido al fenómeno conocido como “polarización por concentración”, que consiste en la acumulación del soluto retenido sobre la superficie de la membrana, lo cual constituye una barrera adicional al pasaje del solvente por la gran diferencia de presión osmótica que se genera a lo largo de la membrana (Noordman et al., 2002). Luego, a medida que se van agregando los diavolumenes de solvente nuevo, el flujo va aumentando por efecto de

la dilución, hasta que se estabiliza. La pequeña caída del flujo hacia el final del proceso también es esperable, y puede ser atribuida tanto a la polarización por concentración, como a la formación de una capa de gel (“fouling”) del soluto que se deposita sobre la membrana (Belhocine et al., 1998; Noordman et al., 2002).

En las FIGURAS 4 y 5 se muestran el pH y la conductividad, respectivamente, tanto del retenido como del permeado, a lo largo del proceso.



**FIGURA 4:** Variación del pH



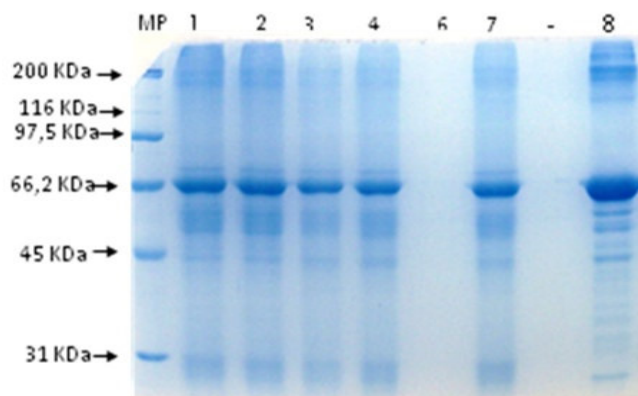
**FIGURA 5:** Variación de la Conductividad

Puede observarse que el proceso de diafiltración no afectó al pH de la muestra, ya que el pH del retenido y el del permeado prácticamente no se modificaron durante todo el proceso. Desde el punto de vista práctico, la constancia del pH permite, en consecuencia, eliminar el monitoreo de esta variable durante la diafiltración de la muestra.

Con respecto a la conductividad, el gráfico muestra que, a partir de seis diavolumenes de buffer utilizados, se consiguió reducir la concentración de sales en la matriz evaluada a valores despreciables (conductividad menor a 10  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). En base a estos resultados, se decidió que el material a desmineralizar posteriormente se diafiltraría contra siete diavolumenes de agua purificada.

En la TABLA 3 se presentan los datos de contenido de proteínas totales de las distintas etapas del proceso, que se corresponden con el SDS-PAGE de la FIGURA 6.

TABLA 3: Proteínas totales Proceso de UF	
Muestra	Concentración de proteína (mg/ml)
1 - Plasma 3 %	32
2 - Sobrenadante de centrifugación	28
3 - Retenido inicial	20
4 - Retenido final	20
5 - Permeado inicial	ND (<0,05 mg/ml)
6 - Permeado final	ND (<0,05 mg/ml)
7 - Plasma secado (3 %)	37



**FIGURA 6:** SDS-PAGE de la diafiltración

Referencias: MP: marcadores de peso molecular; calles 1 a 7: las muestras se corresponden con las de la TABLA 3; calle 8: plasma al final del proceso de diafiltración (a escala mayor). Volumen de siembra: 15  $\mu$ l de cada muestra. Tinción: Coomassie coloidal.

Se confirma claramente que la membrana seleccionada resultó eficaz en retener a las proteínas plasmáticas, ya que no se registró pérdida de proteínas a través del permeado y se mantuvo constante su concentración en el retenido.

En la TABLA 4 se muestran los datos de la evaluación del rendimiento del proceso de obtención de muestra, estimado a partir de las masas secas que se obtuvieron en las distintas etapas del mismo.



<b>TABLA 4: Rendimiento del ensayo piloto de obtención de muestra</b>		
<b>Rendimiento del Proceso</b>	<b>(g)</b>	<b>(%)</b>
Masa inicial	1,5	
Precipitado de centrifugación (masa seca)	0,2	
Masa restante	1,3	
Rendimiento de la etapa		87
Masa recuperada post-secado	0,35	
Rendimiento de la etapa		27
<b>Rendimiento total</b>		<b>23</b>

Tal como puede verse, el proceso general de diafiltración y secado por spray tuvo un rendimiento total del 23 %.

Los resultados conjuntos de los parámetros evaluados en este ensayo preliminar demostraron que el tamaño de poro elegido para la membrana fue adecuado para los fines buscados y también permitieron establecer las condiciones operativas de trabajo de manera exitosa.

#### 3.2.1.2 Diafiltración del plasma

Posteriormente, se realizó la desmineralización de un lote productivo de plasma, acorde al procedimiento evaluado previamente en el ensayo preliminar, sobre el cual se evaluarían las Propiedades Funcionales consideradas. Este plasma desmineralizado y secado presentó un contenido de proteínas totales de 35 mg/ml cuando se preparó una dispersión al 3 % (muestra de trabajo). Su perfil proteico se puede ver en la calle N° 8 del SDS-PAGE de la FIGURA 6.

Al igual que en el Ensayo Preliminar de diafiltración, el rendimiento del proceso se estimó considerando las masas secas obtenidas en las etapas de centrifugación y de secado. Los datos correspondientes se muestran en la TABLA 5, en la cual puede observarse que el rendimiento total del proceso fue del 40 %. El mayor rendimiento obtenido, comparado con el obtenido con el Ensayo Preliminar, se debe al volumen de trabajo del secador por spray; al trabajar con volúmenes muy pequeños, las pérdidas

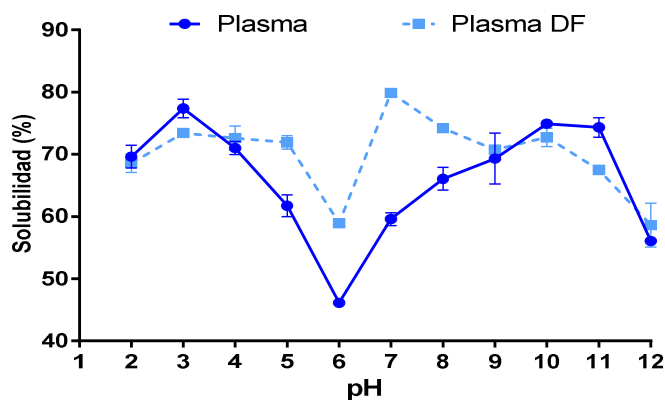
del material que no se puede retirar del equipo son proporcionalmente mucho mayores.

<b>TABLA 5: Rendimiento del proceso de obtención de muestra</b>		
<b>Rendimiento del Proceso</b>	<b>(g)</b>	<b>(%)</b>
Masa inicial	40	
Precipitado de centrifugación (masa seca)	5,5	
Masa restante	34,5	
	Rendimiento de la etapa	86
Masa recuperada post-secado	15,8	
	Rendimiento de la etapa	46
	<b>Rendimiento total</b>	<b>40</b>

### 3.2.2 Propiedades Funcionales

#### 3.2.2.1 Solubilidad

Para estudiar el efecto del pH sobre la solubilidad del plasma bovino deshidratado y la del plasma desmineralizado por diafiltración se utilizaron once valores de pH (rango de 2 a 12) para cada muestra. En la FIGURA 7 se grafican las curvas de solubilidad de dichas muestras obtenidas en función del pH.



**FIGURA 7:** Solubilidad del Plasma y del Plasma Diafiltrado.

Cada punto representa la media de tres muestras  $\pm$  Desviación Estándar.

El análisis estadístico reveló un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) del pH sobre la solubilidad.

El plasma bovino deshidratado presentó una solubilidad mayor al 60 % en casi todo el rango de pH estudiado, con máximos a pH 3 (77 %) y a pH 10 (75 %), y con un descenso significativo (46 %) a pH 6.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros trabajos realizados con plasma bovino. Por ejemplo, Del Hoyo et al. (2008) observaron una solubilidad entre el 65 % y el 80 % en un rango de pH de 3 a 8, con la mínima a pH=6; Rodríguez Furlán et al. (2011a) informaron una solubilidad máxima a pH=7,5 y una mínima a pH entre 4 y 6; Silva y Silvestre (2003) indicaron también una solubilidad alta (entre 70 % y 80 %) en un rango de pH=3-8, con una mínima a pH=5; y Duarte y Sgarbieri (2000), reportaron una solubilidad muy alta (mayor al 90 %) para un concentrado proteico de plasma, con el mínimo a pH entre 5 y 6. Incluso trabajando con plasma porcino, Liu et al. (2010) informaron resultados similares, con la máxima solubilidad a pH=8 (83 %) y la mínima a pH=5 (67 %).

Todos los autores coinciden en atribuir el descenso significativo de la solubilidad a colocar al plasma en un pH correspondiente al punto isoeléctrico de sus proteínas, el cual se situaría aproximadamente entre 4,6 y 6,5, ya que el plasma contiene varias proteínas con diferentes puntos isoeléctricos. En estos valores de pH, las cargas netas de las proteínas serían lo suficientemente débiles como para permitir que las cadenas polipeptídicas se agrupen y la solubilidad disminuya (Tsumura et al., 2005).

Por su parte, la solubilidad del plasma diafiltrado también se ubicó por encima del 70 % en la mayor parte del rango de pH estudiado, disminuyendo a un 60 % en la región de su punto isoeléctrico, a pH 6.

Cuando se comparan directamente las solubilidades de ambas muestras, se puede observar que el proceso de diafiltración mejoró considerablemente la solubilidad del plasma en gran parte del rango de pH estudiado. En efecto, a todos los valores de pH entre 3 y 9, la solubilidad del plasma diafiltrado es significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la del plasma original, alcanzando, en algunos puntos, diferencias de hasta más de un 100 %.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores. Del Hoyo et al. (2008) observaron que las proteínas de plasma bovino deionizadas por ultrafiltración incrementaron significativamente su solubilidad. De manera similar, Rodríguez Furlán et al. (2010) determinaron una mayor solubilidad de las proteínas de plasma bovino, en un rango de pH de 3 a 9, luego de ultrafiltrarlo y liofilizarlo, si se lo compara con el plasma original.

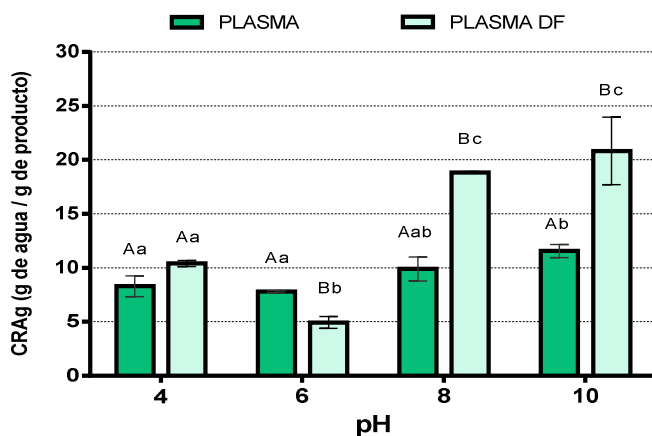
El aumento en la solubilidad del plasma luego de los procesos a los que fue sometido en el presente trabajo (así como en los reportados en la literatura), puede atribuirse a la remoción de algunos de sus componentes insolubles. Efectivamente, los procesos de centrifugación y de ultrafiltración, además de las sales presentes en el plasma, eliminan también elementos macroscópicos insolubles (principalmente, proteínas desnaturalizadas por el proceso de secado en la elaboración de la harina de plasma) (Del Hoyo et al., 2007; Rodríguez Furlán et al., 2011b).

### **Selección de las condiciones a estudiar**

Habiendo obtenido el perfil de la solubilidad del plasma en un rango amplio de pH, se seleccionaron cuatro valores de pH para estudiar su efecto sobre las demás propiedades funcionales. Los cuatro valores elegidos, por ser considerados más representativos, fueron pH=4 (como valor límite para alimentos ácidos), pH=6 (por ser el valor de menor solubilidad), pH=8 (como valor intermedio, en la zona de mayor solubilidad) y pH=10 (como valor límite para alimentos alcalinos).

#### **3.2.2.2 Capacidad de Retención de Agua (CRAg)**

En la FIGURA 8 se grafica el efecto del pH sobre la CRAg del plasma bovino deshidratado y la del plasma diafiltrado.



**FIGURA 8:** Capacidad de Retención de Agua del Plasma y del Plasma Diafiltrado.

Cada barra representa la media de tres muestras  $\pm$  Desviación Estándar. Barras con la misma letra mayúscula para un mismo valor de pH y barras con la misma letra minúscula para una misma muestra no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ).

La CRAg del Plasma resultó mayor en la región alcalina que en la ácida, registrando su mayor valor a pH=10 y su menor valor a pH=6. Estos resultados concuerdan con lo esperado por las características de la interacción proteína-agua, ya que las variaciones en el pH modifican el grado de ionización y la carga neta de las moléculas proteicas, alterando las fuerzas atractivas y repulsivas entre proteínas y su capacidad de asociarse con el agua.

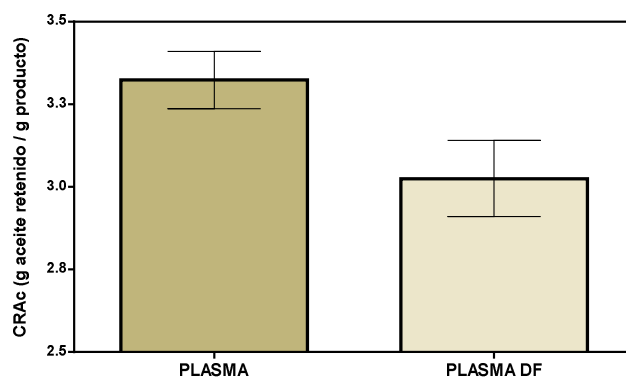
En cambio, en la región de pH correspondiente al punto isoelectrico la hidratación y el hinchamiento se reducen significativamente, ya que son máximas las interacciones proteína-proteína y mínimas las interacciones proteína-agua. Alejándose del punto isoelectrico, tanto hacia la región ácida como hacia la alcalina, las proteínas fijan más agua debido al aumento de la carga neta y de las fuerzas repulsivas. A valores de pH mayores a 9 la capacidad de fijación de agua de la mayor parte de las proteínas es máxima, debido principalmente a la ionización de los restos sulfhidrilo y tirosina (Horianski, 2014).

Al igual que lo observado con el Plasma sin diafiltrar, con el Plasma Diafiltrado la CRAg resultó mayor a valores de pH alcalinos que a pHs ácidos, el mayor valor se registró a pH=10 y el menor a pH=6.

Cuando se comparan entre sí los resultados obtenidos con ambas muestras, se puede observar que la desmineralización del plasma por diafiltración aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) la CRAg del plasma en todos los valores de pH, con excepción del pH del punto isoeléctrico, alcanzando diferencias del 25 % hasta el 90 %. Estos resultados pueden ser atribuidos, al menos parcialmente, al efecto negativo que tendrían las sales del plasma (tanto las naturales propias del plasma como los citratos añadidos) sobre la CRAg de las proteínas plasmáticas, ya que gran parte del agua presente en el medio se fijaría a los iones salinos, provocando la deshidratación de las proteínas (Horiński, 2014).

### 3.2.2.3 Capacidad de Retención de Aceite (CRAc)

En la TABLA 6 y en la FIGURA 9 se presentan los resultados obtenidos para la CRAc del plasma y del plasma diafiltrado.



**FIGURA 9:** Capacidad de Retención de Aceite del Plasma y del Plasma Diafiltrado

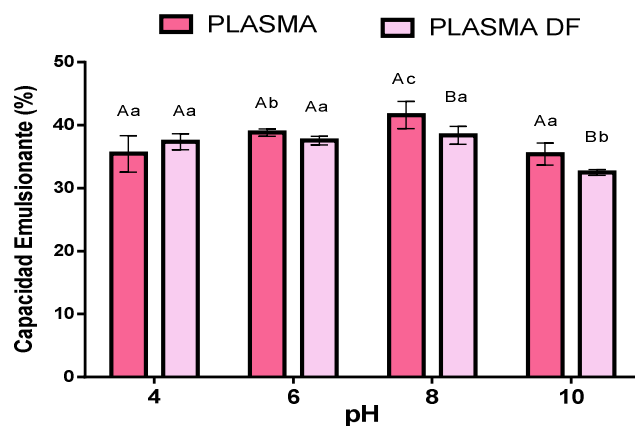
TABLA 6: CRAc del Plasma y del Plasma DF		
	CRAc (g de aceite retenido/g de producto)	
	PLASMA	PLASMA Diafiltrado
Media (5 valores)	3,3	3
Desviación Estándar	0,09	0,16
Coficiente de Variación (%)	2,6	3,8

Se observa que la desmineralización del plasma por ultrafiltración redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) su CRAC.

Varios autores han explicado el mecanismo de absorción de grasas como un atrapamiento físico de las moléculas de aceite y han relacionado la CRAC con las regiones no polares de las cadenas proteicas, así como con diferentes características conformacionales de las proteínas (Pokorný y Kolakowska, 2003; Khalid et al., 2003; Hajar Soltero, 2013). La identificación de los elementos del proceso de diafiltración que serían causantes de la disminución de la CRAC del plasma requeriría de estudios más profundos, que escapan a los objetivos de este trabajo.

#### 3.2.2.4 Propiedades Emulsionantes

En la FIGURA 10 se muestran los resultados obtenidos para la Capacidad Emulsionante (CEm) del plasma y del plasma diafiltrado.



**FIGURA 10:** Capacidad Emulsionante del Plasma y del Plasma Diafiltrado.

Cada barra representa la media de tres muestras  $\pm$  Desviación Estándar.

Barras con la misma letra mayúscula para un mismo valor de pH y barras con la misma letra minúscula para una misma muestra no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ).

Con respecto al plasma, si bien aparecen algunas diferencias estadísticamente significativas entre algunas condiciones, todos los resultados se ubican entre 35 % y 42 % de CEm, con una varianza pequeña (VAR= 9,0; DE=3,0; CV=7,9 %). Los mayores

valores se registraron en la región central del rango de pH, con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a los valores de los extremos del rango.

Para el Plasma Diafiltrado, la Capacidad Emulsionante arrojó los valores más altos en la región central de pH, aunque las diferencias fueron significativas sólo para la muestra acondicionada a  $pH=10$ .

Por otra parte, cuando se comparan entre sí los resultados obtenidos con el plasma y con el plasma diafiltrado, no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las CEm de ambas muestras, si bien podría señalarse una ligera disminución por efecto de la diafiltración en tres de los cuatro valores de pH estudiados.

Al investigar en la bibliografía el efecto del pH sobre las Propiedades Emulsionantes de diferentes matrices proteicas, tanto de origen animal como vegetal, se pueden distinguir, en líneas generales, dos grupos de resultados contradictorios entre sí. Por un lado, varios investigadores encontraron una correlación entre las Propiedades Emulsionantes y la Solubilidad de las matrices con las que trabajaron. Dicha dependencia sería esperable, según citan, en virtud del hecho conocido de que la Capacidad Emulsionante de una proteína completa depende de su balance de cargas eléctricas, el cual es afectado por el pH (Cheftel et al., 1989). En concordancia con esta idea, la mayoría de estos autores informan valores menores de Capacidad Emulsionante en la región del punto isoeléctrico de las proteínas en cuestión, donde la solubilidad es más baja. En cambio, a medida que se alejaban de esta región, la Capacidad Emulsionante aumentaba al incrementarse la carga eléctrica de las proteínas y, en consecuencia, su solubilización. Dentro de este grupo de trabajos pueden incluirse, entre otros, los de Liu et al. (2010) con plasma porcino; Bizzotto et al. (2005), con globina bovina; Alfaro et al. (2004), con proteínas de nueces de Barinas; Zhang et al. (2009), con un extracto proteico de garbanzos; El-Desoki (2009), con suero bovino; Cano-Medina et al. (2011), con concentrados proteicos de semillas de sésamo; e Ivanova et al. (2014), con aislados proteicos de harina de girasol.

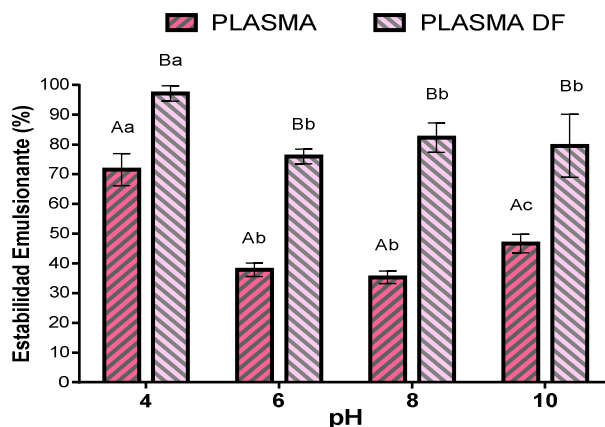
Por el contrario, otros autores informaron valores máximos de las Propiedades Emulsionantes a pH cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas ensayadas, de



manera similar a lo que ocurrió en este trabajo. Voutsinas et al. (1983) sostienen que las capacidades emulsionantes estarían más relacionadas con la hidrofobicidad superficial de las moléculas proteicas que con su solubilidad, siendo las proteínas más hidrofóbicas las que causarían una mayor disminución en la tensión interfacial, mejorando así las propiedades emulsionantes. En la misma línea de pensamiento, Cheftel et al. (1989) postulan que cuanto más hidrofóbica es una proteína, mayor es su concentración en la interfase agua/aceite, lo cual conduce a una emulsión más estable, y Rampon et al. (Rampon et al., 2004; citados en Del Hoyo et al., 2008) adjudican las buenas capacidades emulsionantes en valores de pH próximos al punto isoeléctrico al hecho que, en ese punto, las proteínas adoptan una estructura compacta que no permite su plegamiento y adsorción en la interfase. Otros trabajos que obtuvieron resultados que pueden encuadrarse en esta visión corresponden a los de Silva y Silvestre (2003), con plasma bovino congelado; Del Hoyo et al. (2008), con plasma bovino fresco; y Alvarez et al. (2009), con plasma porcino fresco.

En esta comparación resulta interesante el trabajo de Sorgentini y Wagner (2002), quienes trabajaron con dos fracciones proteicas de soja: un aislado de soja nativa y el suero de soja (que incluye sólo la fracción proteica soluble). Al analizar la Capacidad Emulsionante de estas fracciones en sus respectivos puntos isoeléctricos, observaron una CEm casi nula para el aislado, pero los valores máximos de CEm para el suero. Es decir, diferentes componentes de una misma matriz presentaron comportamientos completamente distintos. Este hecho resulta relevante cuando se considera que el plasma es una matriz sumamente compleja, con cientos de componentes proteicos.

Otro parámetro de interés relativo a las emulsiones es su estabilidad en el tiempo. En la FIGURA 11 se muestran los resultados obtenidos para la Estabilidad Emulsionante (EEm) del plasma y del plasma diafiltrado.



**FIGURA 11:** Estabilidad Emulsionante del Plasma y del Plasma Diafiltrado.

Cada barra representa la media de tres muestras  $\pm$  Desviación Estándar. Barras con la misma letra mayúscula para un mismo valor de pH y barras con la misma letra minúscula para una misma muestra no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ).

A diferencia de lo ocurrido con la Capacidad Emulsionante del plasma, el efecto del pH resultó evidente sobre la estabilidad de las emulsiones formadas. Esta propiedad resultó mayor en ambos extremos del rango de pH ensayado, con un valor más alto a pH ácido que a alcalino y con una reducción en la región cercana al punto isoeléctrico.

Por su parte, la estabilidad de las emulsiones formadas por el plasma diafiltrado resultó mayor al 75 % en todos los valores de pH, siendo mayor a pH ácido, tal como sucedió con la del plasma original.

La comparación entre la EEm del plasma y la del plasma diafiltrado permite apreciar claramente el efecto beneficioso del proceso de diafiltración sobre la EEm, ya que la aumentó en todos los valores de pH, llegando, en algunos casos, a duplicar el valor original.

De manera similar a lo ocurrido con la CEm, al revisar en la literatura el efecto del pH sobre la estabilidad de las emulsiones los resultados provenientes de distintos grupos de trabajo se muestran contradictorios. En este sentido, Silva y Silvestre (2003) mencionan que algunos investigadores informan que los valores máximos de Estabilidad Emulsionante se consiguieron en el punto isoeléctrico, mientras otros autores, al igual que lo observado en este trabajo, describen lo opuesto. Según los

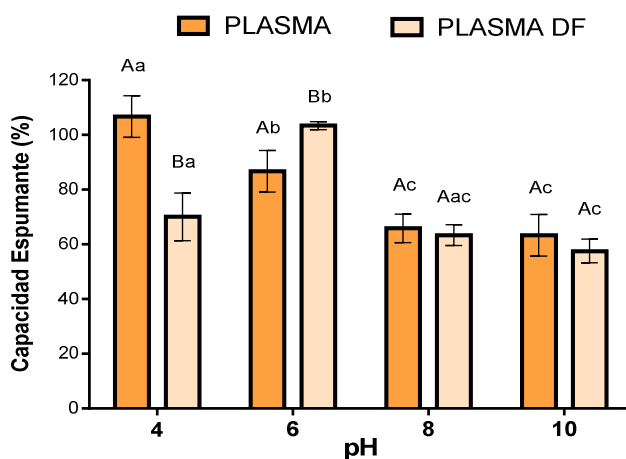
autores citados estas contradicciones pueden ser explicadas parcialmente por la ausencia de estandarización de los métodos usados, así como por el empleo de diferentes concentraciones proteicas, que podrían haber conducido a películas proteicas interfaciales con diferentes propiedades y fuerzas. A nuestra consideración, otros factores importantes a tener en cuenta para realizar comparaciones interlaboratorios deberían ser los métodos de obtención y conservación de las matrices proteicas. Específicamente para el plasma sanguíneo, el método de conservación (enfriamiento, congelación, liofilización o secado por spray) podría llegar a tener un efecto considerable sobre las propiedades del producto final (Dávila Ribot, 2006; Rodríguez Furlán et al., 2011c).

Hung y Zayas (1991)(citados en Khalid et al., 2003) sugieren que, además del pH, varios otros factores podrían afectar la estabilidad de las emulsiones, tales como el tamaño de las gotas, la carga neta, la tensión interfacial, la viscosidad y la conformación de las proteínas. Nuevamente, identificar apropiadamente a los factores responsables de las diferencias observadas entre las distintas matrices requeriría de estudios mucho más específicos.

#### 3.2.2.5 Capacidad Espumante

Cuando se estudian las propiedades espumantes de una proteína se deben tener en cuenta dos aspectos fundamentales: la efectividad en la encapsulación del gas (considerada como Capacidad Espumante), y la vida media de la espuma formada (Estabilidad Espumante). Estas dos propiedades deberían ser vistas como dos procesos separados, ya que son influidas por propiedades moleculares diferentes. La flexibilidad de las proteínas es un factor importante en la reducción de la tensión superficial, lo que permite la difusión de las mismas hacia la interfase aire-agua para encapsular a las partículas de aire. Por su parte, las interacciones proteína-proteína son necesarias para la formación de películas altamente viscoelásticas que rodeen a las burbujas de aire y resistan la difusión de aire desde el interior de las burbujas, aumentando así la estabilidad de las espumas (Ramos-Clamont y Vázquez-Moreno, 2006).

En la FIGURA 12 se grafican los resultados obtenidos para la Capacidad Espumante del plasma y del plasma diafiltrado.



**FIGURA 12:** Capacidad Espumante del Plasma y del Plasma Diafiltrado.

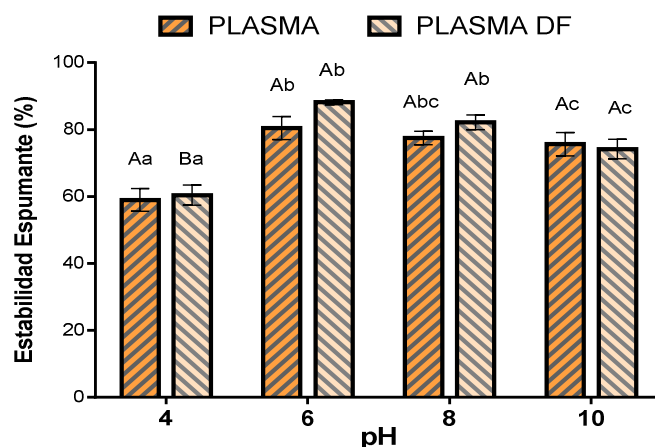
Cada barra representa la media de tres muestras  $\pm$  Desviación Estándar. Barras con la misma letra mayúscula para un mismo valor de pH y barras con la misma letra minúscula para una misma muestra no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ).

El plasma presentó una Capacidad Espumante mayor al 60 % en todos los valores de pH estudiados. Resultó significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en la región ácida que en la alcalina, registrándose su mayor valor a pH=4.

La Capacidad Espumante del plasma diafiltrado, por su parte, mostró un comportamiento similar a la del plasma sin diafiltrar en cuanto a que resultó mayor en la región ácida; en este caso, el mayor valor se registró a pH=6.

La comparación directa de los resultados obtenidos entre ambas matrices no permite establecer una conclusión definitiva sobre el efecto del proceso de diafiltración sobre la Capacidad Espumante del plasma. En tres de los cuatro valores de pH estudiados se registró un valor menor de CEs con el plasma diafiltrado, si bien esta diferencia fue significativa sólo a pH=4. En el pH del punto isoeléctrico, en cambio, la diafiltración aumentó la CEs del plasma.

Con respecto a la Estabilidad (EEs) de las espumas formadas, los resultados obtenidos se muestran en la FIGURA 13.



**FIGURA 13:** Estabilidad Espumante del Plasma y del Plasma Diafiltrado.

Cada barra representa la media de tres muestras  $\pm$  Desviación Estándar. Barras con la misma letra mayúscula para un mismo valor de pH y barras con la misma letra minúscula para una misma muestra no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ).

La espuma formada por el plasma presentó su valor de estabilidad más bajo (cercano al 60 %) a pH 4, el más ácido de los ensayados. En el resto de los valores de pH la EEs estuvo por arriba del 70 %, no observándose diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ).

La estabilidad de la espuma formada por el plasma diafiltrado tuvo un comportamiento similar a la del plasma sin diafiltrar, con el menor valor a pH=4 y valores más altos en la región alcalina.

Por su parte, al comparar directamente la EEs del plasma con la del plasma diafiltrado para analizar el efecto del proceso, se observó que la EEs del plasma diafiltrado fue mayor que la del plasma original en tres de los cuatro pHs estudiados, aunque la diferencia fue significativa ( $p < 0,05$ ) solamente a pH=6.

En forma similar a lo que ocurre con las Propiedades Emulsionantes, con las Propiedades Espumantes también se encuentran en la literatura resultados e

interpretaciones contrapuestas. En relación al efecto del pH sobre las mismas, algunos autores encontraron una correlación entre la Capacidad Espumante y la Solubilidad de las matrices consideradas, observando una disminución en la región del punto isoeléctrico.

Del Hoyo et al. (2008) informaron para el plasma bovino valores de Capacidad y Estabilidad Espumante mayores en la región de pH ácida que en la alcalina, observando los menores valores en la zona del punto isoeléctrico; cuando analizaron el plasma bovino desmineralizado observaron un comportamiento similar. Estos autores atribuyen los mayores valores observados en los extremos del rango de pH a un aumento en la viscosidad. Liu et al. (2010) en su trabajo con plasma porcino también observaron mayores valores en los extremos de pH pero, en su caso, los valores fueron mayores en la región alcalina, tanto para la Capacidad como para la Estabilidad Espumante. Para estos autores, la disminución de estas propiedades en el punto isoeléctrico se debería a que, por su menor solubilidad en este punto, las proteínas no podrían moverse con rapidez hacia la interfase.

También para matrices de origen vegetal se han mencionado casos similares. Por ejemplo, Khalid et al. (2003) determinaron la menor Capacidad Espumante de un concentrado proteico de semillas de sésamo en valores de pH próximos al punto isoeléctrico y los mayores valores en la región de pHs alcalinos. Aluko y Yada (1995), trabajando con aislados de globulina de caupí, obtuvieron un aumento de las Propiedades Espumantes al aumentar los valores de pH. Para todos estos autores, dicho aumento se debería al incremento de las cargas netas de las proteínas, las que aumentarían la flexibilidad de las mismas y les permitirían, en consecuencia, difundir más rápidamente hacia la interfase aire-agua para encapsular a las partículas de aire y aumentar así la formación de espuma. Resultados similares obtuvieron Akintayo et al. (1998) con concentrados proteicos extraídos de semillas de guandú; Alfaro et al. (2004) en un extracto proteico de nueces de Barinas; Cano-Medina et al. (2011), con concentrados proteicos de semillas de sésamo; e Ivanova et al. (2014), con aislados proteicos de harina de girasol.

Otros autores, en cambio, observaron valores más altos para una o ambas propiedades en la región del punto isoeléctrico de la matriz proteica con la que trabajaron, de manera similar a lo observado en este trabajo. Por ejemplo, Arogundade et al. (2006), obtuvieron espumas de extractos proteicos de habas significativamente más estables en su punto isoeléctrico, atribuyéndolas al balance de cargas que favorecerían las interacciones proteína-proteína. Makri y Doxastakis (2005), trabajando con aislados proteicos de otras dos especies diferentes de habas, reportaron una disminución de las capacidades emulsionantes en la región del punto isoeléctrico de dichas matrices, pero un aumento de la estabilidad de las emulsiones formadas a dichos valores de pH.

Para una comprensión más profunda del comportamiento de una matriz compleja como el plasma sanguíneo se necesitaría discriminar el efecto que aportarían por separado cada uno de sus componentes. Por ejemplo, Alvarez et al. (2009) estudiaron algunas propiedades funcionales de las proteínas de la sangre porcina e informaron que las proteínas plasmáticas fibrosas (las globulinas y el fibrinógeno) formaron espumas con volúmenes mayores a valores de pH diferentes de sus puntos isoeléctricos, mientras que las proteínas globulares (globinas y albúminas) formaron las espumas de mayor volumen a pHs similares a los de su punto isoeléctrico.

### 3.2.2.6 Capacidad Antioxidante

En la TABLA 7 se presentan los valores de Capacidad Antioxidante del Plasma deshidratado, evaluado por los dos métodos de secuestro de radicales libres utilizados.

<b>TABLA 7: Capacidad Antioxidante del Plasma Bovino Deshidratado</b>		
<b>% Inhibición</b>	<b>Método DPPH</b>	<b>Método ABTS</b>
Media (2 valores)	15,97	27,35
Desviación Estándar	0,145	0,430
Coefficiente de Variación	0.9%	1,6%

Los resultados obtenidos con los métodos empleados indican que el plasma deshidratado original posee cierta capacidad antioxidante, pero la misma es relativamente baja. Los pocos trabajos hallados en la literatura sobre capacidad antioxidante de componentes de la sangre coinciden en esta tendencia. Gómez y col. (2013) informaron una baja actividad de secuestro de radicales ABTS en plasma bovino, y Liu y col. (2010) obtuvieron una relativamente baja capacidad de secuestro de radicales DPPH con plasma porcino (21 %). Similarmente, aunque con una matriz más diferente, Chang y col. (2007) observaron una actividad secuestrante de DPPH cercana al 22 % con la fracción roja de sangre porcina .

Con respecto al Plasma Desmineralizado por UF, los intentos por evaluar su Capacidad Antioxidante con los métodos empleados resultaron fallidos, ya que todas las muestras preparadas precipitaron al entrar en contacto con los respectivos reactivos de cada técnica, lo cual impidió la correcta lectura de su absorbancia con el espectrofotómetro. Incluso centrifugando luego los preparados y midiendo sus absorbancias, las lecturas resultaron totalmente icongruentes e imposibles de analizar.

Al momento de la finalización de este trabajo, no se contaba con los reactivos necesarios para evaluar la Capacidad Antioxidante mediante métodos no colorimétricos, por lo que no se pudo determinar el efecto del proceso de diafiltración sobre esta Propiedad Funcional del plasma.



### 3.3 – Conclusiones de la Primera Parte

Se lograron establecer las condiciones de los procesos de diafiltración y de secado para obtener plasma desmineralizado en polvo. Si bien el rendimiento global (40 %) fue más bajo de lo deseado, la merma principal se registró en la etapa del secado por spray. De acuerdo con las características del equipo utilizado, el trabajar con volúmenes de muestra mayores probablemente permita disminuir proporcionalmente las pérdidas de material, con lo que aumentaría la eficiencia de recuperación.

La solubilidad del plasma resultó muy buena en un amplio rango de valores de pH. El proceso de diafiltración no solamente no la perjudicó, sino que, incluso, permitió mejorarla en algunos valores de pH.

Los procesos realizados al plasma aumentaron su Capacidad de Retención de Agua. En cambio, su Capacidad de Retención de Aceite disminuyó.

El plasma mostró una Capacidad Emulsionante acorde a lo descrito en la bibliografía, la cual no se vio afectada negativamente por la diafiltración y la posterior deshidratación, procesos que sí aumentaron considerablemente la estabilidad de las emulsiones formadas.

En general, el plasma mostró una gran capacidad para formar espumas, las cuales también resultaron muy estables. Los procesos llevados a cabo con él no parecieron afectar claramente ni a su capacidad espumante ni a la estabilidad de las espumas.

Por su parte, el plasma deshidratado original mostró una Capacidad Antioxidante similar a la descrita en la bibliografía. El efecto del proceso de diafiltración sobre la misma no pudo ser establecido.

En resumen, estos resultados indican que el plasma bovino deshidratado tiene potenciales aplicaciones como aditivo para mejorar algunas propiedades funcionales de alimentos destinados al consumo humano, en cuanto cumpla con los requerimientos higiénico-sanitarios. Además, el plasma bovino desmineralizado serviría también para estos fines, con las ventajas de mejorar sus cualidades organolépticas y de resultar apto para su aplicación en regímenes dietarios.

Obtención de hidrolizados enzimáticos  
de Plasma y evaluación de sus  
Propiedades Funcionales.

## 4.2 – Materiales y Métodos

### 4.1.1 Selección de la enzima

Se ensayaron diferentes enzimas proteolíticas a fin de poder seleccionar la que consiguiera un mayor grado de hidrólisis del plasma bovino. Las enzimas utilizadas, todas donadas gentilmente por Novozymes® (Dinamarca), fueron las siguientes:

- Alcalase® 2.4 L FG, una serina endoproteasa que hidroliza uniones peptídicas internas, producida por *Bacillus licheniformis*.
- Flavourzyme® 1000 L, una exopeptidasa que libera aminoácidos por hidrólisis de uniones peptídicas N-terminales, producida por *Aspergillus oryzae*.
- Neutrase® 0.8 L, una metalo-endoproteasa que hidroliza uniones peptídicas internas, producida por *Bacillus amyloliquefaciens*.

En la TABLA 8 se presentan las principales características de dichas enzimas, según el fabricante.

TABLA 8: Especificaciones de las enzimas utilizadas			
Enzima	ALCALASE	FLAVOURZYME	NEUTRASE
Actividad declarada	2,4 AU-A/g	1.000 LAPU/g	0,8 AU-N/g
Forma física	Líquida	Líquida	Líquida
Densidad aproximada (g/ml)	1,17	1,27	1,26
Temperatura óptima	60-70 °C	45-55 °C	50-55 °C
pH óptimo	8-9	6-7	7-8

Para todos los ensayos preliminares de hidrólisis se preparó como sustrato para las enzimas una dispersión de plasma bovino deshidratado al 5 % (p/v).

Por trabajos previos, se sabe que las hidrólisis enzimáticas de proteínas sanguíneas se ven favorecidas cuando el sustrato recibe un pre tratamiento térmico. Este calentamiento previo produciría el desplegamiento de las proteínas, resultando en una mayor exposición de los sitios de corte de las diferentes proteasas, aumentando así la eficiencia hidrolítica (Wanasundara et al., 2002; Chang et al., 2007). Por este

motivo, la dispersión de plasma preparada se calentó a 95 °C durante 20 min en un baño termostático (Modelo Masson D, Vicking, Argentina). Como este proceso provocó la gelificación del plasma, el sustrato posteriormente se homogeneizó con un disruptor Ultra-Turrax (IKA T-10 Basic, Alemania) durante 2 min a 10.000 rpm, retornando el plasma al estado líquido.

Las reacciones se llevaron a cabo en frascos Schott de 100 ml, colocando en cada uno de ellos 50 ml de sustrato, el cual fue previamente llevado al pH óptimo para cada enzima con NaOH 0,5 M o HCl 0,5 M, según correspondiese. Para las reacciones, los frascos se colocaron en un baño termostático (MEMMERT, Alemania) a la temperatura óptima para cada enzima, con la máxima agitación permitida por el equipo.

Las reacciones se iniciaron cuando el sustrato alcanzó la temperatura deseada, agregando a cada frasco la cantidad de enzima correspondiente. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y se utilizaron controles sin enzimas. Las condiciones de reacción para cada ensayo se muestran en la TABLA 9.

<b>TABLA 9: Condiciones ensayadas en las reacciones enzimáticas</b>			
<b>Enzima</b>	<b>ALCALASE</b>	<b>FLAVOURZYME</b>	<b>NEUTRASE</b>
Volumen de reacción	50 ml	50 ml	50 ml
Temperatura	60 °C	50 °C	50 °C
pH	8	7	7
Volumen de enzima	200 µl	150 µl	500 µl

A los tiempos establecidos se tomaron muestras de 1 ml de cada frasco y se midió el pH de cada uno, ajustándolo a su valor correspondiente con NaOH 0,5 M. Se registró también el volumen de base que se necesitó añadir a cada momento para mantener el pH constante.

Para finalizar la hidrólisis cada muestra se colocó a 95 °C en bloque térmico (AccuBlock, Labnet, EUA) durante 5 min, a fin de inactivar la enzima. Inmediatamente después se colocaron en hielo, y luego se centrifugaron durante 10 min a 10.000 g (Ultra centrífuga Hermle Z 233 MK-2, Alemania). Los sobrenadantes colectados se conservaron en cámara fría hasta su evaluación.

El grado de hidrólisis alcanzado en cada reacción se determinó mediante el método de valoración del protón o del pH-estato (Adler-Nissen, 1986, explicado en Guadix et al., 2000), que relaciona la cantidad de grupos amino liberados luego de la reacción con la cantidad de base consumida para mantener el pH de la reacción constante. Esta relación se basa en que, a medida que avanza la reacción, el grupo carboxilo terminal se disocia por completo y los protones formados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonación de los grupos  $\alpha$ -amino liberados. La base agregada para mantener constante el pH neutraliza únicamente a los protones que son sustituidos por el catión de la base, y luego este consumo de base puede relacionarse con el Grado de Hidrólisis según la ecuación (1) (Guadix et al., 2000).

$$(1) \quad GH = (B N_B / M_p) (1/\alpha) (1/h_t) 10$$

Donde: B = volumen de base consumido (en litros)

M<sub>p</sub> = masa de proteína (en kg)

N<sub>B</sub> = normalidad de la base (eqv/L)

h<sub>t</sub> = número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína nativa

$\alpha$  = grado de disociación de los grupos aminos liberados en la reacción

En estas reacciones se consideró un h<sub>t</sub> de 8,3 eqv/kg, que ha sido reportado para proteínas de la sangre. El valor de  $\alpha$  depende de la temperatura y del pH de la reacción, por lo que correspondió a un valor de 0,93 para la reacción con Alcalase y de 0,53 para las de Flavourzyme y Neutrase (Adler-Nissen, 1986; citado en Figueroa et al., 2012).

#### 4.1.2 Escalado en biorreactor

Para la obtención de hidrolizados del plasma se utilizó la enzima con la que se consiguiera el mayor grado de hidrólisis en los ensayos previos.

A fin de obtener masa suficiente para ensayar todas las propiedades funcionales que se evaluaron en la materia prima original, se prepararon 1.500 ml de una dispersión de plasma al 5 % (p/v).

Para el pre-tratamiento térmico del sustrato se calentó la dispersión de plasma a 95 °C durante 20 min en un baño termostático con agitación (Mettmert, Alemania), y luego se homogeneizó con Ultra Turrax (IKA T-10 Basic, Alemania) durante 2 min a 10.000 rpm.

El sustrato así preparado se colocó en un reactor de vidrio (New Brunswick, Eppendorf, EUA) con capacidad volumétrica total de 2,5 L y sistema para regulación de la temperatura por circulación de agua. La operación del reactor y el registro de los parámetros de la reacción se efectuaron mediante un Controlador New Brunswick Bioflo & Celligen 310, con software BioCommand Batch Control Plus. Para el registro del pH y de la temperatura se utilizaron una sonda Metler Toledo DPAS SC K8S/200 y una sonda Metler Toledo ATEX 3277, respectivamente.

Para la reacción se mantuvieron las mismas condiciones operativas (pH, temperatura y relación enzima/sustrato) que mostraron ser efectivas en el ensayo preliminar. La velocidad de agitación fue de 200 rpm y, cuando el sustrato alcanzó la temperatura deseada de 60 °C, se agregaron 6 ml de la enzima. El pH de la reacción se mantuvo constante en 8 con el agregado automático de NaOH 0,5 N, registrándose permanentemente el volumen de base adicionada.

A los 20 min de la reacción se procedió a retirar la mitad del volumen de la muestra, con el fin de obtener un hidrolizado de bajo grado de hidrólisis. Con el remanente de la muestra se siguió con la reacción hasta los 240 min de proceso, para alcanzar un grado de hidrólisis alto.

Cada una de las dos muestras que se cosecharon fue colocada en baño térmico a 95 °C durante 10 min para inactivar la enzima y luego fue centrifugada durante 20 min a 10.000 g (centrífuga Sartorius SIGMA 6K-15, Alemania). El sobrenadante obtenido de las mismas se congeló hasta su posterior utilización.

El ensayo se repitió, en las mismas condiciones, para tener un duplicado, partiendo de una dispersión de plasma independiente.

#### 4.1.3 Medición de Proteínas y Péptidos

La cantidad de proteínas totales presente en las distintas muestras se valoró cuantitativamente mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951), cuyo fundamento es la formación de un complejo coloreado entre los residuos fenólicos de las proteínas y el reactivo de Folin-Ciocalteu, siendo la intensidad del color formado proporcional a la concentración de proteínas.

Para eliminar la posible interferencia de los compuestos no proteicos se hizo precipitar a las proteínas con ácido tricloroacético; los sobrenadantes resultantes, conteniendo a los compuestos interferentes, se descartaron en forma previa a la reacción de color (Bensadoun y Weinstein, 1976).

Todas las reacciones se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos, confeccionando una curva de calibración con suero albúmina bovina (BSA, Sigma) en cada una de las placas utilizadas. Todas las muestras y todos los puntos de la curva patrón fueron ensayados por triplicado, y se estableció como criterio de aceptación para el ensayo un Coeficiente de Variación (CV) para cada triplicado menor al 15 %.

Las reacciones se midieron colorimétricamente a 690 nm en lector de placas Elisa (Tecan Sunrise-Basic, Alemania).

La cantidad de péptidos liberados por la hidrólisis se evaluó midiendo la cantidad de grupos amino libres por el método de OPA (Church et al., 1983), el cual se basa en la formación de un aducto como consecuencia de la reacción entre los alfa aminoácidos y los reactivos o-phthaldeído y  $\beta$ -mercapto etanol, en medio alcalino. El aducto formado absorbe fuertemente a 340 nm y la intensidad de su coloración es proporcional a la cantidad de grupos amino libres presentes en la muestra.

Las reacciones se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos, confeccionando en cada placa utilizada una curva patrón con el aminoácido lisina. Todas las muestras y todos los puntos de la curva patrón fueron ensayados por triplicado, y se estableció

como criterio de aceptación para el ensayo un Coeficiente de Variación (CV) para cada triplicado menor al 15 %.

Las reacciones se midieron colorimétricamente a 340 nm en lector de placas Elisa (Tecan Sunrise-Basic, Alemania).

#### 4.1.4 Cromatografía de Exclusión Molecular

El proceso de hidrólisis se monitoreó mediante cromatografía líquida, utilizando un cromatógrafo Akta-Purifier (GE, Suecia), provisto de un detector de absorbancia UV (P-900, GE, Suecia) y software Unicorn 5.1 (GE, Suecia) para el procesamiento de los datos.

Las muestras se aplicaron a una columna de exclusión molecular Superdex Peptide 10/300 GL (GE, Suecia), de 24 ml de volumen de lecho, caracterizada por un rango de fraccionamiento de 100-7.000 Da (masa molecular de proteínas globulares) y un límite de exclusión de 20.000 Da.

En forma previa a cada cromatografía la columna fue equilibrada con dos volúmenes de columna (VC) de buffer NaCl 250 mM, pH=8, a un flujo de 0,5 ml/min.

Las muestras fueron previamente filtradas a través de una membrana de PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Pall, EUA) y de cada una se sembró un volumen de 70  $\mu\text{l}$ .

En todos los casos se realizó una elución isocrática, utilizando buffer NaCl 250 mM, pH=8, a un flujo de 0,5 ml/min. La elución de las proteínas y de los péptidos se monitoreó midiendo la absorbancia a 214 nm.

#### 4.1.5 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

La hidrólisis de las proteínas plasmáticas se evaluó también por SDS-PAGE. Se utilizó el mismo equipo descrito en la sección 3.1.1.5 de la Primera Parte.



La concentración de poliacrilamida del gel fue de 16 %. Las muestras se corrieron en condiciones desnaturalizantes y reductoras y se sembraron 15  $\mu$ l de cada una. La corrida electroforética se efectuó a voltaje constante, de 100 V, y duró 120 min.

#### 4.1.6 Evaluación de las Propiedades Funcionales

Para evaluar las Propiedades Funcionales (Solubilidad, Capacidad Emulsionante, Capacidad Espumante y Capacidad Antioxidante) de los hidrolizados se usaron los mismos métodos descritos en la sección 3.1.2 de la Primera Parte.

Los hidrolizados se utilizaron tal cual se obtuvieron luego del proceso de hidrólisis. La dispersión del plasma inicial se centrifugó durante 30 min a 10.000 g, descartando el precipitado obtenido, y se llevó a pH=8, para equipararla a las condiciones de los hidrolizados.

#### 4.1.7 Fraccionamiento por ultrafiltración

A fin de identificar los péptidos con mayor actividad antioxidante, una muestra de una dispersión al 5 % de plasma deshidratado y los dos hidrolizados obtenidos a partir de la misma fueron fraccionados con membranas de ultrafiltración (Pellicon XL, Millipore, EUA), de tamaño de poro de 10 kDa, 5 kDa y 1 kDa. Se obtuvieron así cuatro fracciones de cada muestra (mayor a 10 kDa, entre 10 kDa y 5 kDa, entre 5 kDa y 1 kDa, y menor a 1 kDa), las cuales se conservaron congeladas hasta su utilización.

Con cada una de las fracciones obtenidas se realizó una cromatografía de exclusión molecular, de la misma manera descrita en la sección 4.1.4.

Sobre las fracciones del hidrolizado que mostró mayor capacidad antioxidante se determinó nuevamente la misma, mediante los métodos de DPPH y ABTS ya descritos.

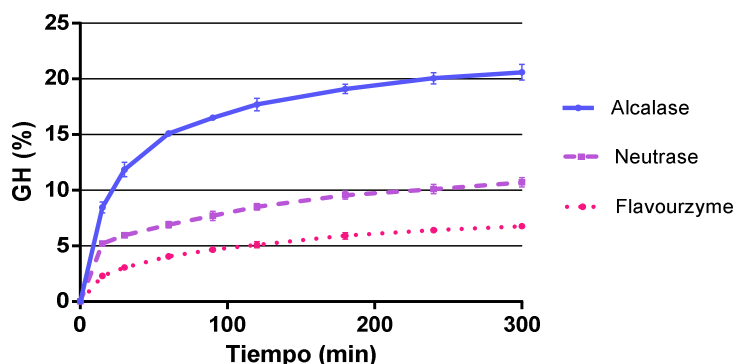
#### 4.1.8 Análisis Estadístico

Todos los ensayos de evaluación de las propiedades funcionales se llevaron a cabo por triplicado. Los datos fueron analizados usando el programa Statistica 8.0 (Stat Soft, Inc.). La significancia de los efectos principales se determinó mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA) de uno o de dos factores, según correspondiese al ensayo. La validez para aplicar este análisis se estableció previamente mediante el test de Levene (homocedacia) y graficando la distribución de los residuos (normalidad). Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las medias se identificaron mediante el test de comparaciones múltiples a posteriori de Duncan.

## 4.2 – Resultados y Discusión de la Segunda Parte

### 4.2.1 Selección de la enzima

En la FIGURA 14 se presentan las curvas de hidrólisis del plasma obtenidas con cada una de las tres enzimas ensayadas.



**FIGURA 14:** Curvas de hidrólisis del Plasma con diferentes enzimas

Cada punto representa la media de 2 réplicas  $\pm$  Desviación Estándar

En las condiciones ensayadas, el mayor grado de hidrólisis se logró con la enzima Alcalase (GH medio= 20,6 %), con la que se obtuvo un valor entre 50 y 70 % mayor que el alcanzado con las otras dos enzimas (GH medio con Neutrased = 13,7 %; con Flavourzyme = 12,3 %).

Otros autores que realizaron hidrolizados enzimáticos de plasma sanguíneo obtuvieron resultados similares en cuanto al grado de hidrólisis máximo alcanzado. Gómez et al. (2013) hidrolizaron plasma bovino con Alcalase y obtuvieron un GH de 19,1 % a los 120 min de reacción. Figueroa et al. (2012) también usaron Alcalase con plasma bovino y obtuvieron un GH mayor al 12 % a los 60 min. Con la misma enzima, pero con plasma porcino, Liu et al. (2010) llegaron a un GH de 17,6 % en 300 min. En cambio, con plasma bovino defibrinado, Wanasundara et al. (2002) consiguieron un GH cercano al 18 % con Alcalase pero uno cercano al 40 % con Flavourzyme. No se encontraron trabajos en los que se usara la enzima Neutrased.

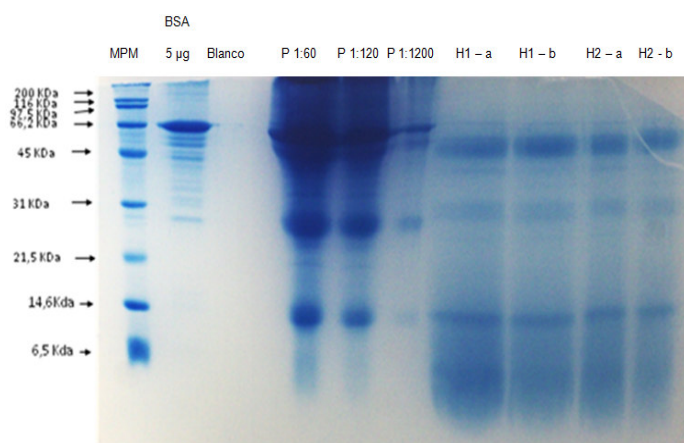
Sin embargo, estos resultados deben ser considerados solamente como orientadores, ya que las condiciones ensayadas no fueron las mismas en todos los casos. Si bien las condiciones críticas para las enzimas (pH y temperatura) fueron las mismas que las utilizadas en este trabajo, otras variables que podrían influir fuertemente en el resultado final (concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de reacción) no lo fueron.

En virtud de los resultados obtenidos, se eligió usar a la enzima Alcalase para obtener los hidrolizados con los que se evaluarían las propiedades funcionales.

#### 4.2.2 Hidrolizados Enzimáticos

Con la hidrólisis enzimática del plasma se obtuvieron dos hidrolizados, con Grados de Hidrólisis estimados de 13 % y de 28 %, respectivamente.

En la FIGURA 15 se muestra el SDS-PAGE del plasma inicial (sembrado con tres diluciones diferentes) y de ambos hidrolizados sembrados sin diluir (cada uno con sus dos réplicas).



**FIGURA 15:** SDS-PAGE del Plasma deshidratado y de sus hidrolizados.

Tinción con Coomassie coloidal.

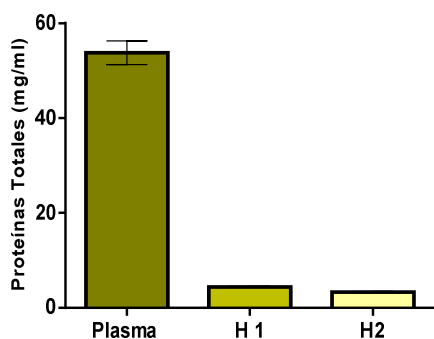
Referencias: MPM: Marcadores de Peso Molecular; BSA: Albúmina bovina sérica; Blanco: buffer de corrida; P: plasma original, en distintas diluciones; H1 y H2: hidrolizados.

Al comparar los hidrolizados con el plasma inicial, puede apreciarse en los hidrolizados una disminución de las bandas proteicas de mayor peso molecular respecto del plasma y la aparición de proteínas de bajo peso molecular en los hidrolizados.

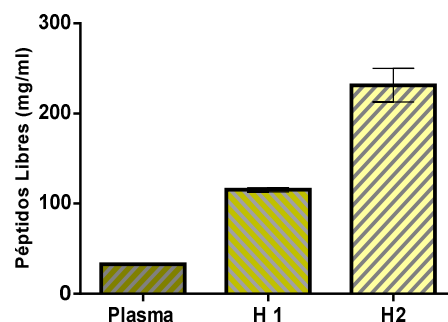
Esta observación es consistente con los datos obtenidos de las mediciones de proteínas y de péptidos en cada muestra, que se presentan en la TABLA 10, que reflejan claramente el descenso en la concentración de proteínas totales con el progreso de la hidrólisis, que se corresponde con el consecuente aumento en la concentración de péptidos libres.

TABLA 10: Concentración de proteínas totales y de péptidos		
	Proteínas Totales (mg/ml)	Péptidos Libres (mg/ml)
Plasma Inicial	53,8 ± 2,55	32,7 ± 0,21
Hidrolizado 1	4,5 ± 0,07	115,4 ± 2,33
Hidrolizado 2	3,4 ± 0,07	231,3 ± 18,74

Esta concordancia se muestra gráficamente en las FIGURAS 16 y 17.



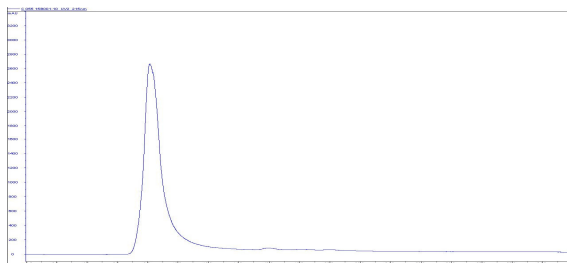
**FIGURA 16:** Concentración de Proteínas



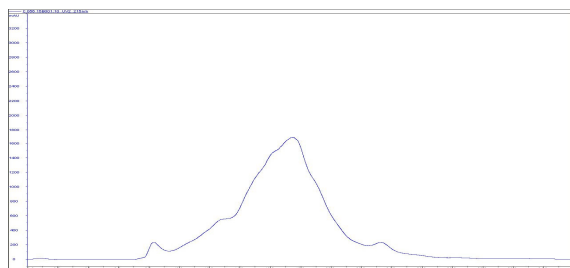
**FIGURA 17:** Concentración de Péptidos Libres

Por su parte, las cromatografías de exclusión molecular realizadas con el plasma y sus hidrolizados también permiten comprobar la eficacia del proceso hidrolítico (FIGURA 18).

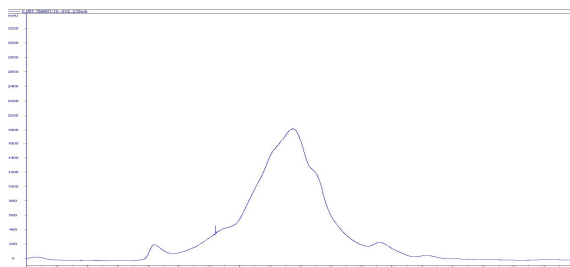
A) Plasma inicial



B) Hidrolizado 1



C) Hidrolizado 2



**FIGURA 18:** Cromatogramas del Plasma y sus hidrolizados

Los tres cromatogramas se presentan en las mismas escalas de  $A_{214}$  nm (mAU) en función del volumen de elución (ml).

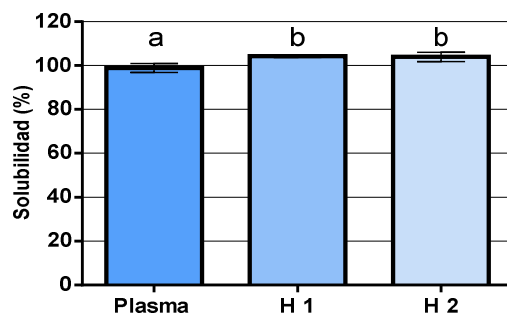
Tal como se aprecia en el cromatograma del Plasma inicial (A), la totalidad de las proteínas del plasma presentan un alto tamaño molecular, eluyendo, en consecuencia, al comienzo del cromatograma. En cambio, en los cromatogramas de los Hidrolizados 1 y 2 (B y C, respectivamente), esas mismas proteínas ya no se observan más,

apareciendo elementos de menor tamaño, que corresponderían a los oligopéptidos formados por el clivaje de las mismas.

### 4.2.3 Evaluación de las Propiedades Funcionales

#### 4.2.3.1 Solubilidad

Como se puede apreciar en la FIGURA 19, ambos hidrolizados mostraron una solubilidad significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la del plasma inicial. Estas diferencias pueden atribuirse a que, al fragmentarse las proteínas en péptidos por efecto de la hidrólisis, quedan expuestos más grupos carboxilo y aminos ionizables, lo que lleva a un aumento de la hidrofiliidad (Yust et al., 2010).



**FIGURA 19:** Solubilidad del Plasma y de sus hidrolizados

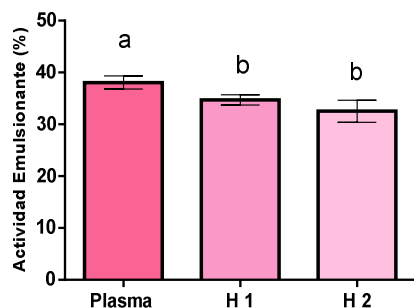
Cada barra representa la media de seis muestras  $\pm$  Desviación Estándar. Barras con distintas letras difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

De manera similar, Liu et al. (2010) también observaron un aumento de la solubilidad del plasma porcino al hidrolizarlo enzimáticamente; según ellos, los péptidos más pequeños son más polares que los polipéptidos no hidrolizados, por lo que pueden formar uniones de hidrógeno más fuertes con el agua, resultando así más solubles en soluciones acuosas.

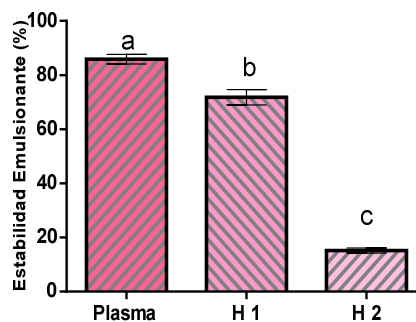
El mismo efecto de la hidrólisis enzimática sobre la solubilidad fue reportado también con distintos sustratos animales y vegetales (Diniz y Martin (1997) con escualos, Villacrés-Poveda (2001) con aislado proteico de choclo, Severin y Xia (2006) con aislado proteico de suero, Chabanon et al. (2007) con globulinas de colza, y Guan et al. (2007) con salvado de avena, entre varios otros.

## 4.2.3.2 Capacidad Emulsionante

En la FIGURA 20 se muestra la comparación entre las actividades emulsionantes obtenidas con cada uno de los hidrolizados plasmáticos y con la del plasma inicial. En la FIGURA 21 se hace lo propio con la estabilidad de las emulsiones formadas con cada uno de esas matrices.



**FIGURA 20:** Actividad Emulsionante



**FIGURA 21:** Estabilidad Emulsionante

Cada barra representa la media de seis muestras  $\pm$  Desviación Estándar.  
Barras con letras diferentes difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Como puede apreciarse en los gráficos, la actividad emulsionante de los hidrolizados resultó significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que la del plasma inicial, y la diferencia entre los dos hidrolizados no fue estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Por el contrario, la estabilidad de las emulsiones formadas con cada matriz resultó significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente entre muestras, observándose una reducción en la Estabilidad Emulsionante con el aumento en el GH.

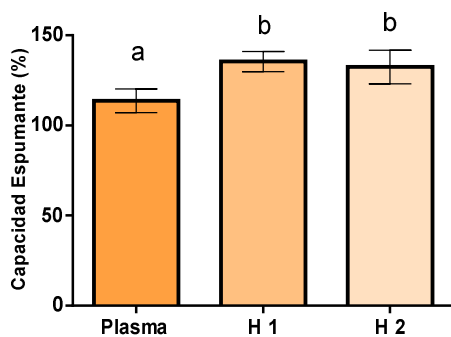
Este efecto negativo de la hidrólisis sobre la capacidad emulsionante del plasma puede deberse, según Tavano (2013), a que la longitud de los péptidos formados es demasiado corta como para permitirles interactuar adecuadamente tanto con la fase acuosa como con la fase no acuosa de la emulsión, cosa que sí consiguen las proteínas intactas. De manera relacionada, otra explicación de la menor eficacia de los péptidos pequeños para estabilizar emulsiones se puede atribuir a que ellos no pueden aglomerarse con tanta facilidad como para producir una membrana que englobe a la grasa debido a las repulsiones de carga (Liu et al., 2010).



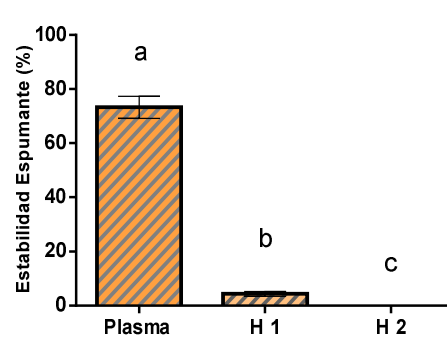
Otros investigadores también observaron este efecto de la hidrólisis enzimática, tanto sobre la actividad como sobre la estabilidad emulsionante. Entre otros trabajos, pueden citarse a Diniz y Martin (1997), Severin y Xia (2006), y Liu et al. (2010), trabajando con matrices de origen animal, y a Guan et al. (2007), Chabanon et al. (2007), Jamdar et al. (2010) y Yust et al. (2010), con matrices de origen vegetal.

#### 4.2.3.3 Capacidad Espumante

La Capacidad Espumante de los hidrolizados plasmáticos obtenidos se muestra en la FIGURA 22 y la Estabilidad Espumante de los mismos en la FIGURA 23.



**FIGURA 22:** Capacidad Espumante



**FIGURA 23:** Estabilidad Espumante

Cada barra representa la media de seis muestras  $\pm$  Desviación Estándar.  
Barras con letras diferentes difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Como puede observarse en la Figura 22, los dos hidrolizados mostraron una Capacidad Espumante significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que la del plasma inicial, sin embargo, no se hallaron diferencias significativas entre las muestras evaluadas para los distintos grados de hidrólisis ( $p > 0,05$ ).

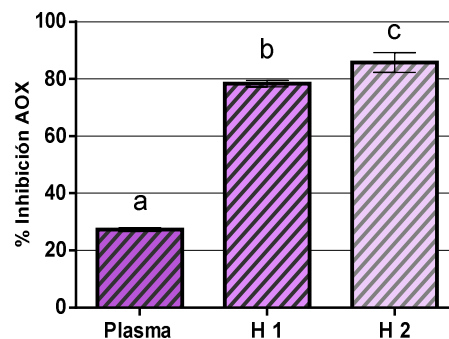
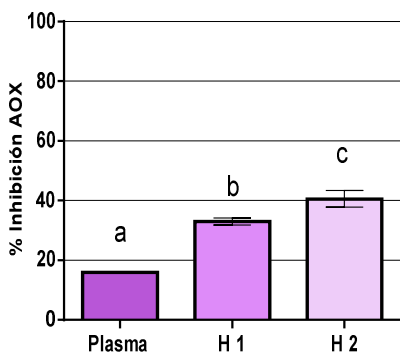
Las diferencias en la estabilidad de las espumas formadas por las distintas matrices, en cambio, resultaron mucho más marcadas (Figura 23). En este caso, la EEs de ambos hidrolizados se redujo en forma altamente significativa ( $p < 0,001$ ) en relación a la del plasma inicial, mostrando incluso el hidrolizado 2 una reducción total para las condiciones evaluadas.

Estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura. Como ya se mencionó en la Primera Parte de este trabajo, para ser buenos agentes espumantes las proteínas deben ser capaces de difundir en forma rápida hacia la interfase aire-agua y de formar una película cohesiva y elástica (Xeverin y Xia, 2005). El aumento de la CEs con una hidrólisis parcial puede atribuirse a modificaciones en las propiedades superficiales de las proteínas. Diniz y Martin (1997) observaron este efecto hidrolizando tejido muscular de escualos y sugirieron que el mismo podía atribuirse a un aumento de la actividad superficial debido a la mayor exposición de cadenas polipeptídicas surgidas por la hidrólisis parcial, que permitirían una mayor incorporación de aire. Para estos mismos autores, en cambio, una hidrólisis más extensiva produciría el efecto opuesto, ya que los pequeños péptidos formados en gran cantidad no tendrían la capacidad de estabilizar las burbujas de aire de la espuma. Resultados similares a estos también fueron reportados por Severin y Xia (2005) con hidrolizados de proteínas de suero bovino, quienes sugirieron que péptidos de cadena larga tiene una mayor probabilidad de poseer al mismo tiempo regiones hidrofílicas e hidrofóbicas para estabilizar las espumas, pero los péptidos pequeños de los hidrolizados perderían esta capacidad de interactuar tanto con la fase acuosa como con la no acuosa, con lo que el aumento excesivo de la carga neta reduciría las interacciones proteína-proteína e impediría la formación de película elásticas en la interfase aire-agua, reduciéndose así la estabilidad de las espumas.

El posible mejoramiento de las propiedades espumantes con una hidrólisis limitada y una disminución de las mismas con un grado de hidrólisis mayor fueron observados con diferentes sustratos y con distintas enzimas (Molina Ortiz y Wagner, 2002; Tsumura et al., 2005; Chabanon et al., 2007; Limam et al., 2008; Condés et al., 2009; Liu et al., 2010; Jamdar et al., 2010).

#### 4.2.3.4 Capacidad Antioxidante

En la FIGURA 24 se presenta la capacidad de secuestro de radicales DPPH del Plasma y de sus dos hidrolizados obtenidos, y en la FIGURA 25 se hace lo propio con la capacidad de secuestro de radicales ABTS.



**FIGURA 24** Capacidad Antioxidante (DPPH) **FIGURA 25:** Capacidad Antioxidante (ABTS)

Cada barra representa la media de dos muestras  $\pm$  Desviación Estándar.  
Barras con letras diferentes difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Con ambos métodos empleados se pudo observar un aumento altamente significativo ( $p < 0,001$ ) de la capacidad antioxidante del plasma deshidratado al ser hidrolizado con la enzima Alcalase con un grado de hidrólisis del 13 %. También con ambos métodos se registró un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la actividad antioxidante al incrementarse el GH de 13 % a 28 %. Estos resultados coinciden con datos previos obtenidos por otros autores (Liu et al, 2010; Gómez et al., 2013).

Está descrito que el aumento en la Capacidad Antioxidante por efecto de la hidrólisis enzimática puede atribuirse, al menos parcialmente, a los cambios estructurales sufridos por las proteínas durante la acción enzimática, ya que estas promueven la apertura de las cadenas peptídicas y la exposición de residuos de aminoácidos activos y capaces de reaccionar con oxidantes (Kong y Xiong, 2006).

Además de aumentar la captación de radicales libres, la fragmentación de las proteínas tendría otro efecto beneficioso sobre la capacidad antioxidante. Hirose y Miyashita (1999; citados en Liu et al, 2010) propusieron que los hidrolizados proteicos podrían servir como membranas que recubrirían a las gotas de lípidos, protegiéndolos contra los iniciadores de los procesos oxidativos. Presumiblemente, al acortarse, los péptidos serían más anfotéricos y estructuralmente más flexibles, lo que les permitiría difundir fácilmente hacia la interfase agua-aceite y adsorberse en la membrana fosfolipídica de los liposomas, en donde ocurren los procesos de oxidación.

Las diferencias en los valores y proporciones de los resultados obtenidos en este trabajo con los dos métodos empleados para evaluar la actividad de secuestro de radicales libres pueden deberse a las diferencias entre los mecanismos de acción antioxidante medidos y en las condiciones usadas en los diferentes análisis. Es sabido que, por ejemplo, el pH del medio y la solubilidad del antioxidante juegan un papel importante en la determinación de la capacidad antioxidante de un compuesto (Yanishlieva, 2001).

Este efecto beneficioso de la hidrólisis enzimática sobre la Capacidad Antioxidante también fue observado por Gómez et al. (2013) quienes, al hidrolizar plasma bovino con la enzima Alcalase, observaron un aumento de la captación de radicales ABTS en función del grado de hidrólisis alcanzado, llegando a un incremento de hasta seis veces para el hidrolizado que obtuvieron con un GH = 19,1 %, con respecto al plasma no hidrolizado.

De manera similar, hidrolizando plasma porcino con la enzima Alcalase, Liu et al. (2010) observaron que la actividad secuestrante de radicales DPPH aumentaba a medida que se incrementaba el grado de hidrólisis.

#### 4.2.4 Separación de las Fracciones por UF

A fin de identificar los péptidos con mayor actividad antioxidante, tanto el plasma como sus dos hidrolizados se separaron por ultrafiltración en cuatro fracciones cada uno, de acuerdo a su tamaño molecular. Para comprobar la eficacia de la separación y estudiar la distribución de peso molecular de sus respectivos componentes, con cada una de las doce fracciones obtenidas se realizó una cromatografía de exclusión molecular. En la FIGURA 26 se presentan los correspondientes cromatogramas, ordenados por muestra y por el tamaño de los componentes de la fracción.

Analizando los cromatogramas, se puede observar que:

- Se confirma nuevamente que el plasma deshidratado original está compuesto casi exclusivamente por proteínas de peso molecular mayor a 10 kDa, las cuales van disminuyendo a medida que avanza el proceso de hidrólisis.

- En forma correspondiente, en los hidrolizados van aumentando los péptidos de menor tamaño.
- Como era de esperar, al comparar ambos hidrolizados se observa que el de mayor grado de hidrólisis presenta la mayor proporción de péptidos más pequeños.

Dado que el Hidrolizado 2 (de GH = 28 %) fue el que mostró mayor Capacidad Antioxidante, se evaluaron las fracciones obtenidas por ultrafiltración con los dos métodos de secuestro de radicales libres utilizados, a fin de identificar las de mayor actividad.

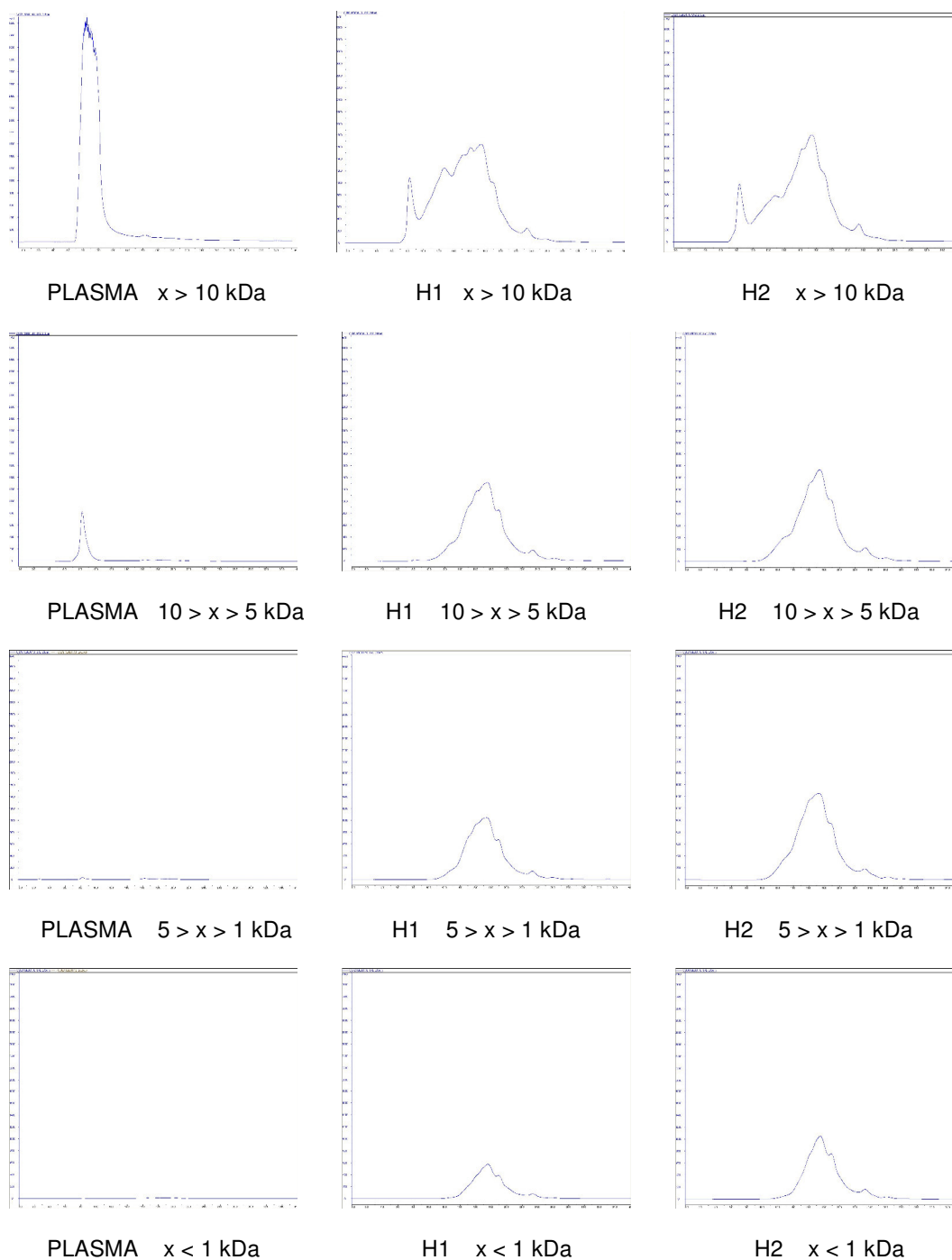
En la TABLA 11 se muestran los resultados obtenidos.

<b>TABLA 11: Capacidad Antioxidante de las Fracciones del Hidrolizado 2</b>		
<b>Fracción</b>	% Inhibición	
	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>
< 1 kDa	31,9 ± 4,20 ( a )	60,2 ± 5,71 ( a )
Entre 1 kDa y 5 kDa	25,7 ± 0,94 ( ab )	55,6 ± 3,75 ( a )
Entre 5 kDa y 10 kDa	21,1 ± 2,87 ( b )	50,0 ± 1,88 ( a )
> 10 kDa	5,7 ± 0,75 ( c )	49,9 ± 3,99 ( a )

Cada valor es la media de dos muestras ± Desviación Estándar.  
Letras diferentes entre valores de una misma columna (Método) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Con los dos métodos utilizados se obtuvo una mayor actividad antioxidante en la fracción de péptidos más pequeños (menores a 1 kDa), observándose una relación inversa entre el tamaño de los componentes de la fracción y su actividad antioxidante. Sin embargo, y si bien se observa esta tendencia, solo pudieron determinarse diferencias estadísticamente significativas entre muestras con el método de DPPH ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos similares, en los que hidrolizaron plasma con la enzima Alcalase (Liu et al, 2010; Gómez et al., 2013).



**FIGURA 26:** Cromatogramas de las fracciones obtenidas por ultrafiltración del Plasma y de sus hidrolizados.

Todos los cromatogramas se presentan en las mismas escalas de Absorbancia a 214 nm (mUA) y volumen de elución (ml).

### 4.3 – Conclusiones de la Segunda Parte

La enzima Alcalase, en las condiciones ensayadas, resultó efectiva para hidrolizar a las proteínas del plasma bovino deshidratado, obteniéndose fragmentos proteicos y péptidos de distinto tamaño molecular.

Los hidrolizados obtenidos resultaron ligeramente más solubles que el plasma deshidratado original.

La hidrólisis con Alcalase afectó notoriamente a las propiedades surfactantes de las proteínas plasmáticas. Con respecto a las Propiedades Emulsionantes, tanto la Actividad Emulsionante como la Estabilidad Emulsionante de los hidrolizados resultaron significativamente menores que las del plasma original, efecto que se acentuó con el aumento del grado de hidrólisis alcanzado. En relación a las Propiedades Espumantes, si bien la hidrólisis enzimática aumentó la Capacidad Espumante del plasma, la Estabilidad de las espumas formadas disminuyó drásticamente.

La hidrólisis enzimática con Alcalase aumentó marcadamente la Capacidad Antioxidante del plasma deshidratado. Los hidrolizados obtenidos presentaron una actividad de secuestro de radicales libres significativamente mayor que el plasma original. Esa mayor actividad antioxidante resultó asociada al menor tamaño de los péptidos obtenidos.

En resumen, los hidrolizados obtenidos a partir del plasma bovino deshidratado con la enzima Alcalase no mostraron ser potencialmente útiles para ser utilizados como aditivos alimenticios para mejorar las Propiedades Surfactantes de los alimentos. En cambio, tanto los hidrolizados como los péptidos aislados demostraron poseer un alto potencial antioxidante, que los haría viables para ser utilizados como aditivos conservantes para reducir el enranciamiento lipídico de los alimentos, y así prolongar la vida útil de los mismos.

## 5 – Discusión Final

El presente trabajo muestra que el plasma bovino deshidratado, tanto en su forma original como desmineralizado, tiene potenciales aplicaciones como aditivo alimentario para mejorar las propiedades funcionales de los alimentos, y los hidrolizados que se obtuvieron de él con la enzima Alcalase poseen una alta capacidad antioxidante. De ser viable su uso en alimentos humanos, esto aumentaría el valor agregado de este producto, lo que justificaría la inversión económica necesaria para elaborar estos productos de manera que sean autorizados por los organismos sanitarios pertinentes.

Estos eran los objetivos planteados originalmente para esta Tesis, los cuales se consideran cumplidos. No obstante lo cual, este trabajo representa sólo el primer paso, necesario pero no suficiente, para la aplicación de estos productos como aditivos alimentarios humanos. Para tal fin se requerirían otros estudios adicionales.

En primer lugar, deberían realizarse todos los estudios microbiológicos correspondientes, así como los del potencial alergénico de estos productos (Taylor y Hefle, 2006). Por otra parte, los ensayos “in vitro” efectuados aquí evaluaron la funcionalidad de las proteínas y de los péptidos estudiados como simples coloides; el paso siguiente necesario sería evaluar su desempeño en diferentes matrices alimenticias reales, ya que las proteínas y los péptidos tienen la habilidad de interactuar con otros componentes de la matriz alimenticia, como carbohidratos y lípidos, y también pueden perder su actividad durante las operaciones de procesamiento, tales como su cocción (Branen y Haggerty, 2002).

Otras cuestiones a considerar tienen que ver con los posibles efectos sobre el sabor o el color de los alimentos a los cuales se añadirían y otros problemas organolépticos. Es sabido que ciertos aminoácidos confieren sabor amargo, el cual puede llegar a ser muy importante en el caso de los hidrolizados., que pueden dejar más expuestos a este tipo de residuos aminoacídicos (Nielsen, 2010; Gaudette y Pickering, 2013).

El tema, en particular, de los hidrolizados y de los péptidos merece un párrafo aparte. Al estudiar su potencial efecto antioxidante en este trabajo, el objetivo estuvo puesto en su posible uso como aditivos para reducir los cambios oxidativos de los alimentos



durante su almacenamiento, y así prolongar la vida útil de los mismos. Pero, además, varios trabajos efectuados en la última década han aportado evidencias sobre los beneficios para la salud que tendrían diferentes péptidos, incluyendo la reducción del riesgo de algunas enfermedades degenerativas tales como cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y enfermedades inflamatorias, asociadas con el estrés oxidativo (Sarmadi y Ismail, 2010; Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

Más aún; además de su potencial antioxidante, se han identificado numerosos péptidos derivados de diferentes fuentes alimenticias con otras actividades biológicas diferentes, entre las que se pueden mencionar la antihipertensiva, neuroactiva, anticolesterolémica, inmunomoduladora, antimicrobiana, y la acción reguladora de minerales y hormonas (un amplio panorama sobre péptidos bioactivos puede encontrarse en los libros de Mine y Shahidi, 2006, y Hernández-Ledesma y Hsieh, 2013).

Esta naturaleza multifuncional de los antioxidantes peptídicos hace que, en la preferencia de los consumidores, resulten candidatos más atractivos que los antioxidantes no peptídicos como ingredientes dietarios (Bruhn, 2002; Samaranayaka y Li-Chan, 2011).

Sin embargo, para considerar el potencial bioactivo de los péptidos derivados de alimentos como promotores de la salud, debería tenerse en cuenta la posibilidad de modificaciones o degradaciones que puedan llegar a sufrir durante la digestión gastrointestinal. Estas posibles alteraciones se las ha intentado estudiar en algunos trabajos, simulando las condiciones que encontrarían los péptidos en su pasaje por el tracto digestivo (Gómez et al., 2013; Pokora et al., 2013; Gómez-Sampedro y Zapata-Montoya, 2014). En este sentido, en el último tiempo los esfuerzos se están concentrando en desarrollar sistemas de transporte específicos que aumenten la biodisponibilidad y la vida media de los péptidos bioactivos, destacándose la micro y la nanoencapsulación (Agyei y Danquah, 2011; Cabuk et al., 2014; Mohan et al., 2015).

También es importante identificar la forma en la que los péptidos pueden ser incorporados a la matriz alimentaria, ya que ese factor influirá en los costos de producción del alimento en cuestión. Un hidrolizado crudo puede ser económicamente

más viable que un aislado peptídico puro o semipurificado, ya que toda etapa de purificación tiene un costo económico asociado, tanto por el proceso en sí cuanto por la pérdida de rendimiento, que incidirá en el balance global. Sin embargo, otros factores también deben ser considerados: los extractos crudos pueden contener varias clases diferentes de péptidos, que pueden actuar en forma sinérgica entre sí y ejercer acciones biológicas mayores que las que tendrían si estuviesen por separado. Como contrapartida, otros componentes de los extractos crudos, tales como pigmentos y trazas de lípidos, pueden causar problemas de color y/o de flavor (Muro et al., 2013).

Por último, en la producción de hidrolizados a gran escala el costo de las enzimas de uso industrial puede llegar a ser un factor limitante. Para reducir estos costos se pueden utilizar dos tipos de tecnologías, que aumentan la eficiencia del proceso. Uno de ellos es el uso de enzimas inmovilizadas en un sustrato sólido, que permite utilizar a la misma cantidad de enzima un número repetido de veces (Halling et al., 2005; Laurent et al., 2008; Datta et al., 2013). La otra tecnología se conoce como reactor de membrana y consiste en acoplar un sistema de ultrafiltración al biorreactor en el que se lleva a cabo la hidrólisis enzimática. La membrana de ultrafiltración utilizada debe tener un tamaño de poro tal que permita la salida de los péptidos que se van formando, a la vez que impida el pasaje de la enzima, la cual queda retenida y actuando en forma continua. Además de maximizar el uso de la enzima, esta metodología también reduce los costos de producción al eliminar la necesidad de utilizar calor para inactivar a la enzima en el final del proceso (Nielsen y Olsen, 2002; Pouliot et al., 2006; Wei y Chiang, 2008).

Como suele suceder en las distintas ramas de la Ciencia y la Tecnología, cada paso que se consigue dar en un camino, abre un espectro muy amplio de nuevos caminos a seguir. Esperamos que este trabajo contribuya en ese sentido.

---

## 6 - REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256-1262.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Publishers.
- Agyei, D. and Danquah, M. (2011). Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 29, 272-277.
- Aitken, A. and Learmonth, M. (2009). Chapter 1: Protein determination by UV absorption. En: *The Protein Protocols Handbook, Third Edition*. John Walker Ed., Humana Press.
- Akintayo, E., Oshodi, A. and Esuoso, K. (1999). Effects of NaCl, ionic strength and pH on the foaming and gelation of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein concentrates. *Food Chemistry*, 66, 51-56.
- Alfaro, M., Alvarez, I., El Khor, S. and Padilla, F. (2004). Functional properties of a protein product from *Caryodendron orinocense* (Barinas nuts). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54, 223-228.
- Aluko, R. and Yada, R. (1995). Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*, 53, 259-265.
- Alvarez, C., Bances, M., Rendueles, M. and Díaz, M. (2009). Functional properties of isolated porcine blood proteins. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 807-814.
- Arogundade, L., Tshay, M., Shumey, D. and Manazie, S. (2006). Effect of ionic strength and/or pH on extractability and physico-functional characterization of broad bean (*Vicia faba L.*) protein concentrate. *Food Hydrocolloids*, 20, 1124-1134.
- Banach, J., Lin, Z. and Lamsal, B. (2013). Enzymatic modification of milk protein concentrate and characterization of resulting functional properties. *LWT – Food Science and Technology*, 54, 397-403.
- Belhocine, D., Grib, H., Abdessmed, D., Comeau, Y. and Mameri, N. (1998). Optimization of plasma proteins concentration by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 142, 159-171.
- Belitz, H.D., Grosch, W. and Schieberle, P. (2009). Food Chemistry (4<sup>th</sup> Edition). *Springer-Verlag, Berlin*.

- Beltrán, C. y Perdomo, W. (2007). Aprovechamiento de la sangre de bovino para la obtención de harina de sangre y plasma sanguíneo en el matadero santa Cruz de Malambo Atlántico. *Tesis Facultad de Ingeniería de Alimentos, Universidad de La Salle, Bogotá.*
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976). Assays of proteins in the presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry* 70, 241-250.
- Bizzotto, C., Capobiango, M. and Coelho Silvestre, M. (2005). Evaluation of functional properties of a blood protein. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4, 11-16.
- Bourne, M.C. (2002). Food Texture and viscosity: concept and measurement. *Academic Press, London.*
- Branen, A. and Haggerty, R. (2002). Chapter 1: Introduction to food additives. En: *Food Additives, Second Edition*, A. Branen, P. Davidson, S. Salminen and J. Thorngate, Eds., Marcel Dekker, New York.
- Bruhn, C. (2002). Chapter 6: Consumer attitudes toward food additives. En: *Food Additives, Second Edition*, A. Branen, P. Davidson, S. Salminen and J. Thorngate, Eds., Marcel Dekker, New York.
- Cabuk, B., Okuklu, B., Stanciuc, N. and Harsa, S. (2014). Nanoencapsulation of biologically active peptides from whey proteins. *Journal of Nutritional Health & Food Science*, 2 (3), 1-4.
- Cano-Medina, A., Jiménez-Islas, H., Dendooven, L., Patiño-Herrera, R., González-Alatorre, G. and Escamilla-Silva, E. (2011). Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. *Food Research International*, 44, 684-692.
- Cervini, M. L. (2014). Secuencias operativas de faena. *Cátedra de Producción de bovinos de carne. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.*
- Condés, M., Scilingo, A. and Añón, M. (2009). Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 963-970.
- Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S. and Marc, I. (2007). Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. *Process Biochemistry*, 42, 1419-1428.
- Chang, Chi-Yue, Wu, Kuei-Ching and Chiang, Shu-Hua. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100, 1537-1543.

- Cheftel, J., Cuq, J. y Lorient, D. (1989). Proteínas alimentarias. *Editorial Acribia, Zaragoza, España*.
- Church, F., Swaisgood, E., Porter, D., and Catignani, G. (1983). Spectrophotometric assay using *o*-phthaldialdeyhde for determination of proteolysis in milk and isolated milk protein. *Journal of Dairy Science*, *66*, 1219-1227.
- Dailloux, S., Djelveh, G., Peyron, A. and Oulion, C. (2002). Rheological behaviour of blood plasmas concentrated by ultrafiltration and by evaporation in relation to liquid-gel transition temperature. *Journal of Food Engineering*, *55*, 35-39.
- Datta, S., Christena, L., Rajaram, Y. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, *3* (1), 1-9.
- Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M. and Díaz, M. (2007). Demineralization of animal blood plasma by ion Exchange and ultrafiltration. *Meat Science*, *76*, 402-410.
- Del Hoyo, P., Rendueles, M. and Díaz, M. (2008). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, *78*, 522-528.
- Diniz, F. and Martin, A. (1997). Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensm.-Wiss u.-Technol.*, *30*, 266-272.
- Duarte, R. e Sgarbieri, V. (2000). Propriedades funcionais tecnológicas das frações protéicas de sangue bovino: plasma e globina. *Brazilian Journal of Food Technology*, *3*, 23-30.
- El-Desoki, W. (2009). Influence of acidity and sodium chloride on the function properties of whey protein powder. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, *4*, 150-153.
- Elias, R., Kellerby, S. and Decker, E. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*, 430-441.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat Science*, *89*, 259-279.
- Evans, D., Romero, J. and Westoby, M. (2009). Concentration of proteins and removal of solutes. En: *Guide to protein purification, Second Edition. Methods in Enzymology, Vol 463, Burgess, R. y Deutscher, M. (Editores). Academic Press-Elsevier*.
- Fernando, T. (1981). Concentration of animal blood by ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, *23*, 19-27.

- Figuroa, O., Zapata, J. y Gutiérrez, G. (2012). Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino. *Revista EIA (Escuela de Ingeniería de Antioquia, Colombia)*, N° 17, 71-84.
- Gaudette, N. and Pickering, G. (2013). Modifying bitterness in functional food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 464-481.
- Gómez, L., Figuroa, O. y Zapata, J. (2013). Actividad antioxidante de hidrolizados enzimáticos de plasma bovino obtenidos por efecto de Alcalasa® 2.4 L. *Información Tecnológica*, 24, 33-42.
- Gómez Sampedro, L. and Zapata Montoya, J. (2014). Effects of hydrolysis and digestion in vitro on the activity of bovine plasma hydrolysates as inhibitors of the Angiotensin I Converting Enzyme. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 (3), 386-393.
- Guadix, A., Guadix, E., Páez-Dueñas, M., González-Tello, P. y Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41 (1), 79-89.
- Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L. and Zhang, M. (2007). Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chemistry*, 101, 163-170.
- Halling, P., Ulijn, R. and Flitsch, S. (2005). Understanding enzyme action on immobilized substrates. *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (4), 385-392.
- Heo, S., Park, E., Lee, K. and Jeon, Y. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96, 1613-1625.
- Hernández-Ledesma, B. and Hsieh, C. (Eds.). (2013). Bioactive food peptides in health and disease. *In Tech Publishers, Croacia*.
- Hijar Soltero, B. (2013). The production of protein isolates from aqueous extraction of de-hulled yellow mustard flour and determination of their functional properties. *Tesis Departamento de Ingeniería Química y Química Aplicada, Universidad de Toronto, Canadá*.
- Hirose, A. and Miyashita, K. (1999). Inhibitory effect of proteins and their hydrolysates on the oxidation of triacylglycerols containing docosahexaenoic acids in emulsions. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 46, 799-805.
- Horianski, M. (2014). Propiedades funcionales de las proteínas. *Cátedra de Química y Bioquímica de los alimentos, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones*.
- Hung, S. and Zayas, J. (1991). Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour. *Journal of Food Science*, 56, 1216-1223.

- Ivanova, P., Chalova, V. and Koleva, L. (2014). Functional properties of proteins isolated from industrially produced sunflower meal. *International Journal of Food Studies*, 3, 203-212.
- Jamdar, S., Rajalakshmi, V., Pednekar, M., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121, 178-184.
- Khalid, E., Babiker, E. and Tinay, A. (2003). Solubility and functional properties of sesame seed proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, 82, 361-366.
- Kinsella, J.E. and Whitehead, D.M. (1989). Proteins in whey: chemical, physical and functional properties. En: *Advances in food and nutrition research*. J. Kinsella. Academic Press, 343-438.
- Klompong, V., Benjal, S., Kantachota, D. and Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 1317-1327.
- Kolakowska, A. and Sikorski, E. (2003). Chapter 1 The role of lipids in food Quality. En: *Chemical and functional properties of food lipids*. Z. Sikorski y A. Kolakowska Eds. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Kolakowska, A. and Bartosz, G. (2014). Chapter 1 Oxidation of food components. An introduction. En: *Food oxidants and antioxidants. Chemical, biological and functional properties*. Grzegorz Bartosz (Ed.). CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Kong, B. and Xiong, Y. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6059-6068.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Laurent, N., Haddoub, R. and Flitsh, S. (2008). Enzyme catalysis on solid surfaces. *Trends in Biotechnology*, 26 (6), 328-337.
- Lawhon, J., Carter, C. and Matril, K. (1972). A comparative study of the whipping potential of an extract from several oil seed flours. *Cereal Science Today*, 17, 240-244, 246, 294.
- Limam, Z., Sadok, S. and El Abed, A. (2008). Enzymatic hydrolysis of shrimp head waste: functional and biochemical properties. *Food Biotechnology*, 22, 352-362.

- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. and Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118, 403-410.
- Lowry, O., Rosenbrough, N., Farr, L. and Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Luyten, H., Vereijken, J. and Buecking, M. (2004). Chapter 18 Using proteins as additives in foods: an introduction. En: *Proteins in food processing*. R.Y. Yada Ed. CRC Press LLC, Boca Raton.
- Madrid, A. (1999). Aprovechamiento de los subproductos cárnicos. *Mundi-Prensa, Madrid*.
- Makri, E. and Doxastakis, G. (2005). Emulsifying and foaming properties of *Phaseolus vulgaris* and *coccineus* proteins. *Food Chemistry*, 98, 558-568.
- Martínez, J., Medina, O. y Zambrano, R. (2011). Estudio fisicoquímico funcional de los aislados proteicos en semillas de maracuyá (*Passiflora edulis*). *Bistua*, 9 (1), 70-76.
- McNairney, J. (1984). Modification of a novel protein product. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34B, 206-214.
- Millán, F., Vioque, J., Alaiz, M., Pedroche, J. y Yust, M. (2002). Hidrolizados proteicos en alimentación. En: *Proteínas y polisacáridos como ingredientes funcionales*. María C. Añón y Ana M. Pilosof (Eds.). Editorial de la Universidad de La Plata.
- Millipore Corporation. 1997. ProFlux M12 Tangential Filtration System. Operating Instructions & Validation Guide. Massachussets.
- Mine, Y. and Shahidi, F. (Eds.). (2006). Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. *Nutraceutical Science and Technology Series (4)*, CRC Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Mohan, A., Rajendran, S., He, Q., Bazinet, L. and Udenigwe, C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *The Royal Society of Chemistry Advances*, 5, 79270-79278.
- Molina Ortiz, S. and Wagner, J. (2002). Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food Research International*, 35, 511-518.
- Muro, C. Riera, F. and Fernández, A. (2013). Chapter 10. Advancements in the fractionation of milk biopeptides by means of membrane processes. En: *Bioactive food peptides in health and disease*, Blanca Hernández-Ledesma y Chia-Chien Hsieh, Eds., In Tech, Croacia.



- Naczki, M., Diosady, L. and Rubin, L. (1985). Functional properties of canola meals produced by a two-phase solvent extraction system. *Journal of Food Science*, 50, 1685-1692.
- Nielsen, P. (2010). Chapter 13: Enzymes in protein modification. En: *Enzymes in Food Technology (Second Edition)*, R. Whitehurst and M. van Oort (Eds.), Blackwell Publishing, Iowa.
- Nielsen, P. and Olsen, H. (2002). Chapter 6: Enzymic modification of food protein. En: *Enzymes in Food Technology*, R. Whitehurst and B. Law (Eds.), CRC – Sheffield Academic Press, Boca Raton.
- Noordman, T., Ketelaar, T., Donkers, F. and Wesselingh, J. (2002). Concentration and desalination of protein solutions by ultrafiltration. *Chemical Engineering Science*, 57, 693-703.
- Ofori, Jack Appiah and Hsieh, Yu-Hwa Peggy. (2012). The use of blood and derived products as food additives. En: *Food Additive, Prof. Yehia El-Samragy (Ed.). In Tech*.
- Panyam, D. and Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 120-125.
- Pearce, K. and Kinsella, J. (1978). Emulsifying properties of protein: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716-723.
- Peng, X., Xiong, Y. and Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry*, 113, 196-201.
- Pokora, M., Eckert, E., Zambrowicz, A., Bobak, L., Azoltysik, M., Dabrowska, A., Chrzanowska, J., Polanowski, A. and Trziszka, T. (2013). Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food Science and Nutrition*, 1 (2), 184-195.
- Pokorný, J. (2001). Introduction. En: *Antioxidants in food. Practical applications*, J. Pokorný, N. Yanishlieva y M. Gordon (Eds.). CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Pokorný, J. and Kolakowska, A. (2013). Chapter 17 Lipid-protein and lipid-saccharide interactions. En: *Chemical and functional properties of food lipids*. Z. Sikorski y A. Kolakowska (Eds.) CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Pouliot, Y., Gauthier, S. and Groleau, P. (2006). Chapter 32. Membrane-based fractionation and purification strategies for bioactive peptides. En: *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease*. Yoshinori Mine and Fereidoon Shahidi, Eds., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.

- Prandl, O., Fischer, A, Schmidhofer, T. y Sinell, H. (1994). Tecnología e higiene de la carne. *Ed. Acribia, Zaragoza*.
- Ramos-Clamont, M. and Vázquez-Moreno, L. (2006). Foaming properties of porcine serum and porcine serum albumin. *Ciencia y Tecnología Alimentaria, 5, 105-111*.
- Rampon, V., Brossard, C., Mouhous-Riou, N., Bousseau, B., Llamas, G. and Genot, C. (2004). The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin. A front-surface fluorescence study. *Advances in Colloid and Interface Science, 108-09, 87-94*.
- Reineccius, G. (2006). Flavor chemistry and technology (Second Edition). *CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton*.
- Rodríguez Furlán, L., Pérez Padilla, A. and Campderrós, M. (2010). Functional and physical properties of bovine plasma proteins as a function of processing and pH: Application in a food formulation. *Advance Journal of Food Science and Technology, 2 (5), 256-267*.
- Rodríguez Furlán, L., Pérez Padilla, A. y Campderrós, M. (2011a). Plasma bovino tecnológicamente mejorado para aplicaciones alimenticias. *La Alimentación Latinoamericana, 293, 44-48*.
- Rodríguez Furlán, L., Rinaldoni, A. Padilla, A. and Campderrós, M. (2011b). Assessment of functional properties of bovine plasma proteins compared with other protein concentrates, Application in a hamburger formulation. *American Journal of Food Technology, 6 (9), 717-729*.
- Rodríguez Furlán, L., Lecot, J., Pérez Padilla, A., Campderrós, M. and Zaritzky, N. (2011c). Effect of saccharides on glass transition temperatures of frozen and freeze dried bovine plasma protein. *Journal of Food Engineering, 106, 74-79*.
- Samaranayaka, A. and Li-Chan, E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment and potencial applications. *Journal of Functional Foods, 3, 229-254*.
- Sarmadi, B. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides, 31, 1949-1956*.
- Severin, S. and Xia, W. (2006). Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry, 30, 77-97*.
- Shahidi, F., Han, X. and Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry, 53, 285-293*.

- Shibamoto, T. (2014). Chapter 12. Measuring the antioxidant activity of food components. En: *Food oxidants and antioxidants. Chemical, biological and functional properties*. G. Bartosz Ed. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Sikorski, Zdzislaw E. (2007). Chapter 6 The role of proteins in food. En: *Chemical and functional properties of food components. (Third Edition)*. Z. Sikorski Ed. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Sikorski, Z. and Piotrowska, B. (2007). Chapter 1 Food Components and Quality. En: *Chemical and functional properties of food components. (Third Edition)*. Z. Sikorski Ed. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Silva, V. and Silvestre, M. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *LWT. Food Science Technology*, 36, 709-718.
- Sorgentini, D. and Wagner, J. (2002). Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. *Food Research International*, 35, 721-729.
- Tavano, O. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 90, 1-11.
- Taylor, S. and Hefle, S. (2006). Chapter 19. Introduction to food allergy. En: *Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. Yoshinori Mine and Fereidoon Shahidi, Eds., CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton*.
- Torres, M., Marín, F., Ramos, A. and Soriano, E. (2002). Study of operating conditions in concentration of chicken blood plasma proteins by ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, 54, 215-219.
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W. and Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT. Food Science Technology*, 38, 255-261.
- Venskutonis, P. (2014). Chapter 9. Natural antioxidants in food systems. En: *Food oxidants and antioxidants. Chemical, biological and functional properties*. G. Bartosz Ed. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Villacrés Poveda, C. (2001). Obtención de un hidrolizado enzimático de alta funcionalidad a partir del choclo (*Lupinus mutabilis Sweet*). *Tesis del Departamento de Ciencia de Alimentos y Biotecnología, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador*.
- Voutsinas, L., Cheung, E. and Nakai, S. (1983). Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *Journal of Food Science*, 48, 26-32.

- Wan, Y., Ghosh, R. and Cui, Z. (2002). High-resolution plasma protein fractionation using ultrafiltration. *Desalination*, 144, 301-306.
- Wanasundara, P., Amarowicz, R., Pegg, R. and Shand, P. (2002). Preparation and characterization of hydrolyzed proteins from defibrinated bovine plasma. *Journal of Food Science*, 67, 623-630.
- Wang, J., Zhao, M., Yang, X. and Jiang, Y. (2006). Improvement on functional properties of wheat gluten by enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*, 44, 93-100.
- Wei, J. and Chiang, B. (2008). Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatica membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 372-378.
- Yanishlieva, N. (2001). Chapter 3: Inhibiting oxidation. En: *Antioxidants in food. Practical applications*, J. Pokorný, N. Yanishlieva y M. Gordon (Eds).CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Yousif, A., Cranston, P. and Deeth, H. (2003). Incorporation of bovine dry blood plasma into biscuit flour for the production of pasta. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36, 295-302.
- Yu, J., Ahmedna, M. and Goktepe, I. (2007). Peanut proteins concentrate: production and functional properties as affected by processing. *Food Chemistry*, 103, 121-129.
- Yust, M., Pedroche, J., Millán-Linares, M., Alcaide-Hidalgo, J. and Millán, F. (2010). Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilized Alcalase. *Food Chemistry*, 122, 1212-1217.
- Zamora, R., Delgado, R. and Hidalgo, F. (2014). Chapter 8 Effects of oxidation on the nutritive and health-promoting value of food components. En: *Food oxidants and antioxidants. Chemical, biological and functional properties*. Grzegorz Bartosz (Ed.). CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- Zayas, J.F. (1997). Functionality of proteins in food. *Springer-Verlag, Berlin*.
- Zhang, T., Jiang, B., Mu, W. and Wang, Z. (2009). Emulsifying properties of chickpea protein isolates: Influence of pH and NaCl. *Food Hydrocolloids*, 23, 146-152.