

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA



MEMORIA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
TECNOLOGÍA Y CALIDAD DE LOS ALIMENTOS

Raúl Pérez Gálvez

Granada, 2006

Memoria que presenta el ingeniero químico Raúl Pérez Gálvez para obtener el Diploma de Estudios Avanzados.

Granada, 10 de Junio de 2006

Fdo. Raúl Pérez Gálvez

Dr. Antonio María Guadix Escobar, Profesor Ayudante Doctor de Ingeniería Química de la Universidad de Granada.

Dra. Emilia María Guadix Escobar, Profesora Titular de Ingeniería Química de la Universidad de Granada.

Como profesores responsables del período de investigación tutelada del doctorando Raúl Pérez Gálvez

INFORMAN

que el Trabajo de Investigación: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS PARA LA OBTENCIÓN DE ABONOS ORGÁNICOS ha sido realizado en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada.

Los resultados expuestos en esta Memoria corresponden fielmente a los obtenidos. La presente Memoria ha sido revisada por nosotros, encontrándola conforme para ser presentada por Raúl Pérez Gálvez para obtener el Diploma de Estudios Avanzados.

Dr. Antonio María Guadix Escobar

Dra. Emilia María Guadix Escobar

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Antonio y Emilia María Guadix Escobar por su interés en mi formación, paciencia y dedicación durante la dirección de este trabajo de investigación.

A mis compañeros del Grupo de Investigación de Biorreactores, por su ayuda desinteresada y los buenos momentos pasados juntos durante estos años.

A todos los miembros del departamento de Ingeniería Química por su apoyo y ayuda durante mi formación y desarrollo de la investigación.

INTRODUCCIÓN	7
<u>PERÍODO DE DOCENCIA</u>	<u>8</u>
TECNOLOGÍAS EMERGENTES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	9
TECNOLOGÍA DE LAS GRASAS.....	13
CONTROL ESTADÍSTICO DE CALIDAD	18
CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIOS NO ACUOSOS. LÍPIDOS ESTRUCTURADOS	23
TECNOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE EMULSIONES Y DISPERSIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA.....	27
TECNOLOGÍA Y APLICACIONES DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	31
TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS	38
<u>PERÍODO DE INVESTIGACIÓN</u>	<u>42</u>
1.RESUMEN	43
2. INTRODUCCIÓN	44
2.1. ABONOS ORGÁNICOS.....	44
2.1.1. Fertilizantes en base a aminoácidos.....	46
2.1.2. Fuentes de obtención de fertilizantes orgánicos.....	48
2.2. SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL	48
2.2.1. La sangre de cerdo.....	50
2.2.2. Propiedades funcionales de la sangre	52
2.2.3. Valor nutricional de la sangre.....	53
2.2.4. Poder contaminante de la sangre	54
2.2.5. Revalorización y aprovechamiento de la sangre	54
2.2.6. La harina de sangre.....	55
2.3. HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS	57
2.3.1. Sustratos proteínicos.....	58
2.3.2. Proteasas comerciales	58
2.3.3. Grado de hidrólisis	59
2.4. MÉTODO DE ANÁLISIS DE SUPERFICIES DE RESPUESTA	62
2.4.1. Fundamento matemático de las superficies de respuesta	62
2.4.2. Diseños experimentales	63
2.5. FUNDAMENTOS DE LA OPTIMIZACIÓN MULTIOBJETIVO.....	65
2.6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	68
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	71
3.1. MATERIALES	71
3.1.1. Harina de sangre	71
3.2.2. Alcalasa.	72
3.2. MÉTODOS	72
3.2.1. Reactor enzimático	72
3.2.2. Determinación del grado de hidrólisis.....	73
3.2.3. Determinación del porcentaje de sólidos en suspensión.	76
3.2.4. Diseño de experimentos.	77

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	79
4.1. DISEÑO DE EXPERIMENTOS	79
4.2. CURVAS DE HIDRÓLISIS.....	80
4.3. SUPERFICIES DE RESPUESTA	85
4.3.1. Grado de hidrólisis.....	85
4.3.2. Sólidos en suspensión.....	88
4.3.3. Efecto de las variables de operación.....	90
4.4. OPTIMIZACIÓN MULTIOBJETIVO.....	92
5. CONCLUSIONES	96
6. BIBLIOGRAFÍA	97

INTRODUCCIÓN

Según la legislación vigente que regula el tercer ciclo de estudios universitarios, la obtención y expedición del título de Doctor y otros estudios de postgrado, para obtener el reconocimiento de suficiencia investigadora es necesario obtener un mínimo de 32 créditos en el programa adscrito, distribuido en dos períodos:

1. Período de docencia: mínimo 20 créditos, que deben comprender:
 - Cursos fundamentales: mínimo 15 créditos.
 - Cursos metodológicos.
2. Período de investigación: mínimo 12 créditos, en el que se desarrolla uno o varios trabajos de investigación tutelados.

Ambos períodos se han realizado dentro del programa de doctorado “**Tecnología y calidad de los alimentos**”, cuyos departamentos responsables son el Departamento de Ingeniería Química (Facultad de Ciencias) y el Departamento de Nutrición y Bromatología (Facultad de Farmacia). Los responsables del período de investigación tutelada han sido los doctores Antonio y Emilia M^a Guadix Escobar

A lo largo del presente trabajo se detallarán los cursos realizados y superados durante el período de docencia, así como el trabajo de investigación tutelada correspondiente al período de investigación.

PERÍODO DE DOCENCIA

TECNOLOGÍAS EMERGENTES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

PROFESORES

Dr. Gil Hernández, Ángel

RESUMEN DEL CURSO

El objetivo de este curso de doctorado es definir y clasificar lo que se entiende por alimento funcional, así como presentar los distintos métodos de procesado de alimentos que se están desarrollando en la actualidad.

Atendiendo a su funcionalidad podemos distinguir dos tipos de alimentos:

- *Alimentos Prebióticos.* Actúan como sustrato para los microorganismos intestinales, o bien dada su composición química pueden prevenir alguna enfermedad. Fundamentalmente consisten en alimentos fuente de mono y disacáridos, fibras insolubles, lípidos estructurados con contenido en ácidos grasos como el omega-3 o proteínas específicas. El contenido de estos alimentos en el principio activo debe estar determinado científicamente, sin causar nocividad su exceso, si bien se ha comprobado que concentraciones de sustrato superiores a la óptima pueden no causar el efecto deseado e incluso inhibir el crecimiento del microorganismo.
- *Alimentos Probióticos.* Contienen en su composición una carga microbiana suficiente para asegurar que llegará una fracción superviviente suficiente al intestino. La digestión elimina la mayor parte del contenido inicial de microorganismos, por ataque ácido y enzimático. Productos de este tipo se comercializan en la actualidad, en forma generalmente líquida o tipo yogur, con contenido en bifidobacterias y bacterias lácticas fundamentalmente.

Otro bloque fundamental del curso lo constituye la aplicación de nuevas tecnologías en el procesado del alimento.

Tradicionalmente, el procesado de alimentos se ha asentado en el uso de energía térmica para la esterilización y para la conservación.

El procesado térmico del alimento supone la exposición del alimento a elevadas temperaturas durante un periodo de tiempo variable. Estas condiciones ambientales extremas restringen la población microbiana presente, a costa de desnaturalizar a su vez biomoléculas presentes en el alimento no procesado, volatilizar compuestos que inicialmente conferían aroma al alimento, inducir reacciones como generación de productos inicialmente no presentes y provocar por último cambios estructurales (a nivel proteico, fundamentalmente), que van a incidir macroscópicamente en cambios de textura y sabor final del alimento.

Los métodos no térmicos se presentan como una alternativa a este tratamiento térmico, dado que pueden ofrecer alimentos procesados frescos, con pérdida mínima en el color, sabor, y contenido en nutrientes. El uso de campos eléctricos

pulsantes PEF (Pulsed Electric Fields), altas presiones, luz pulsante, disminución de la concentración de agua, congelación , etc, pueden subsanar los inconvenientes asociados al tratamiento térmico, con iguales niveles en inactivación microbiana.

Como parte del curso se nos propuso un trabajo asociado a alguno de los tres bloques abordados (alimentos prebióticos, probióticos, y nuevas técnicas de procesado de alimentos). Por mi parte escogí como tema para mi trabajo la pasterización de productos líquidos mediante campos eléctricos pulsantes (PEF).

Básicamente, el procesado por campos eléctricos pulsantes consiste en la exposición del alimento, durante intervalos de 2-50 μ s a voltajes eléctricos del orden de 10.000-100.000 V. Cada intervalo de descarga se denomina pulso, siendo un importante parámetro de diseño el número y frecuencia de los pulsos.

Uno de los productos más favorables a la aplicación de pulsos eléctricos es el zumo de naranja. El zumo presenta en su composición azúcares tales como fructosa, ácidos orgánicos, peptinas, lípidos, vitaminas y sales disueltas, siendo el componente más interesante desde el punto de vista de tratamiento tecnológico las peptinas, puesto que éstas determinan la turbidez, y por tanto aspecto final del zumo. El aumento de turbidez en el zumo se debe a la presencia de un enzima, la pectinesterasa, que cataliza la reacción de despolimerización de la pectina, por rotura del enlace o-glicosídico. Esta reacción trae como consecuencia la precipitación de la pulpa en suspensión y su separación del líquido clarificado, empeorando la presentación del producto.

Por otro lado, la acidez del zumo determina que la población microbiana y en especial la presencia de esporas sea muy reducida, por lo que el tratamiento térmico en el zumo pretende básicamente inactivar la acción de este enzima, estando asociado a pérdidas vitamínicas, volatilización de aromas, y generación de subproductos debidos a reacciones de oxidación favorecidas por la temperatura.

En este caso el tratamiento eléctrico nace de la necesidad de proveer al zumo una pasterización que inactive la pectinesterasa y la población microbiana patógena presente, y que permita un procesado en frío del alimento.

Un esquema básico de un sistema de procesado por pulsos consta de cinco componentes: una fuente de potencia, un banco de condensadores, un sistema de interrupción de la corriente, una o varias cámaras de tratamiento, sondas de voltaje, temperatura y corriente, así como un equipo de envasado aséptico.

La fuente de potencia debe ser capaz de captar energía de la red utilitaria para obtener corriente de alto potencial, que utiliza para la carga del banco de condensadores.

Éstos a su vez descargarán la energía sobre la cámara de tratamiento donde se confina el alimento.

Dependiendo de la disposición del grupo de condensadores podremos también generar la forma del pulso, intentando siempre operar con pulsos cuadrados, los

más eficaces energéticamente, en los cuales el potencial alcanza rápidamente un máximo que mantiene durante el tiempo de tratamiento para caer hasta cero y generar otro pulso.

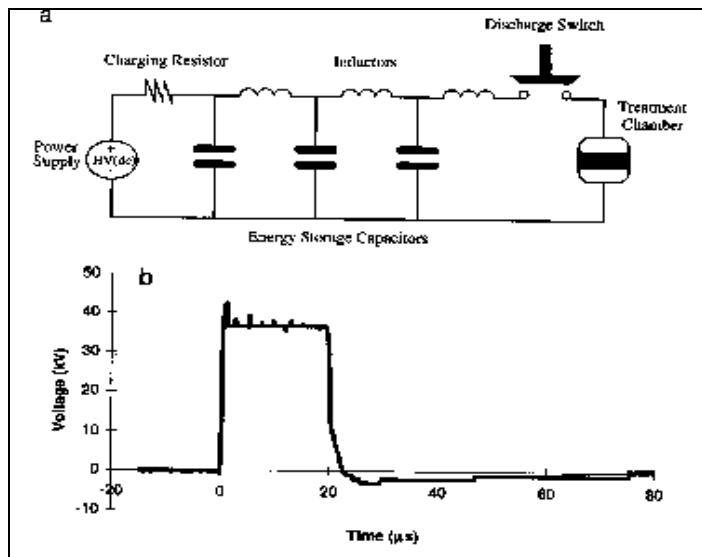


Figura 1. Generación de un pulso cuadrado. Bancada de condensadores

Otro aspecto que traté en mi trabajo, fueron los efectos biológicos que el procesado por pulsos eléctricos induce sobre la población microbiana. La inactivación de microorganismos se puede explicar por un doble efecto: la rotura de membrana y la electroporación.

- *Rotura de membrana.* Al aplicar un campo eléctrico intenso, las cargas iónicas del alimento se polarizan concentrándose a ambos lados de la membrana celular, que actúa como condensador eléctrico. Esto genera una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana (citoplasma y medio circundante) que comprime paulatinamente la membrana llegando a su rotura.
- *Electroporación.* La membrana celular se estructura en dos capas de fosfolípidos, atravesada por proteínas. Estas estructuras proteicas transversales se conocen como “canales proteicos”, y dado al carácter anfótero de las mismas permiten la conducción de la electricidad. La aplicación de un pulso eléctrico genera una corriente a través de estos canales que origina que las capas de lípido se desnaturalen por efecto Joule (calentamiento eléctrico), generándose poros y aumentando el tamaño de los ya existentes, hasta vaciado del contenido celular.

Por último se hace una valoración técnica y económica de las posibilidades de que este procesado se implante en un futuro a escala industrial. Las principales limitaciones que presenta este procesado son el coste del equipo y la vida relativamente corta del equipo de pulsos.

BIBLIOGRAFÍA

- Allen Foegeding, E., Davis, J., Doucet, D. and McGuffey, M. *Advances in modifying and understanding whey protein functionality*. Trends in Food Science & Technology, 13(2002), 151-159.
- Barbosa-Cánovas, G.V; Góngora-Nieto, N.M., Pothakamury, U.R., Swanson, B.G. *Preservation of foods with pulsed electric fields*. Adademic Press Ltd. London
- Boza, J., Jiménez, J., Baró, L, Martínez-Agustín O., Suárez, M.D. y Gil, A. *Effects of native and hydrolyzed whey protein on intestinal repair of severely starved rats at weaning*. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 22(1996), 186-193
- Boza, J., Jiménez, L, Martínez-Agustín O., Suárez, M.D. y Gil, A. *Nutrition value and antigenicity of two milk protein hydrolysates*. Journal of Nutrition, 124 (1994), 1978-1986.
- Frank Devlieghere, Lieve Vermeiren, Johan Debeverre. *New Preservation Technologies: Possibilities and limitations*. Dairy Journal 14(2004) 273-285.
- Jiménez, J. y Gil, A. *Función de los nucleótidos de la dieta en el metabolismo lipídico*. Nucleótidos y Nutrición (1993).
- Joseph H. Hulse. *Biotechnologies: past history, present state and future prospects*. Trends in Food Science and Technology.
- M.M. Góngora-Nieto, P.D. Pedrow, B.G. Swanson, G.V. Barbosa-Cánovas. *Energy análisis of liquid whole egg pasteurizad by pulsed electric fields*. Journal of Food Engineering 57(2003) 209-216
- T.R. Gowrishankar, R.C. Lee, J.C. Weaver. *Characterization of Cell Membrana Electroporation*. Center for Computations Science and Technology.

TECNOLOGÍA DE LAS GRASAS

PROFESORES

Dr. Martínez Nieto, Leopoldo

RESUMEN DEL CURSO

El presente curso abarca, básicamente, los aspectos siguientes:

- Caracterización y extracción de grasas por disolventes. Extracción supercrítica.
- Operaciones de refinación y transformación de grasas para su uso alimentario e industrial.
- Tratamiento de subproductos y residuos: Aprovechamiento y depuración.

La producción de grasas a nivel industrial viene justificada por un doble interés:

- Su uso alimentario, con un consumo de 11 Kg/habitante.año
- Materia prima químico-industrial. Como compuestos derivados de las grasas tenemos detergentes, jabones, barnices y pinturas, si bien estas dos aplicaciones están cayendo en desuso en la actualidad.

A modo introductorio, se estudió la evolución en el consumo y aplicaciones de estas grasas desde la década de 1960 hasta la actualidad, definiendo varias etapas:

- 1.- Disminución de las aplicaciones industriales por cambio a derivados del petróleo y desplazamiento al campo alimentario.
- 2.- Descenso del consumo de aceite de oliva por introducción de soja y girasol.
- 3.- Avances científico-tecnológicos del aceite de palma: de la pulpa de la palma se extrae el aceite de palma, y del hueso el aceite de palmiste. El principal inconveniente del aceite de palma es que solidifica con facilidad. En este aceite podemos llevar a cabo un fraccionamiento obteniendo dos fases: una fase sólida y una fase líquida que se destina a uso doméstico. Por posterior hidrogenación se transforma en margarinas.
- 4.- El avance en las tecnologías de hidrogenación, que permite actuar sobre los dobles enlaces introduciendo o eliminando insaturaciones.
- 5.- A principios de los 80 se descubre que el aceite de oliva es bueno para preservar al organismo de enfermedades coronarias, esta relación directa se conoce como el binomio aceite de oliva-salud.

Se introducen dos nuevos índices para determinar la calidad de los aceites atendiendo a este aspecto:

- %PUFA / %SAFA : es la relación existente entre el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PoliUnsaturated Fatt Acids) y ácidos grasos saturados (Saturated Fatt Acids).
- Alfa-tocoferol/%PUFA . Relación existente entre el contenido en vitamina E (alfa-tocoferol) y los ácidos grasos poliinsaturados.

6.-Se imponen nuevas tecnologías en extracción de aceites de oliva y vegetales. Se pasa de la tradicional prensada a la centrifugación, que ofrece un mayor rendimiento en la extracción, y evita operaciones de limpieza y malos sabores en el aceite, consecuencia de fermentaciones no deseadas.

7.- En la década de los 90 se introducen los primeros aceites vegetales modificados genéticamente. Concretamente, estas modificaciones se introdujeron para obtener un aceite de girasol con alto contenido en ácido oleico, y así poder competir en el mercado con el aceite de oliva.

8.-En la actualidad, se están dedicando importantes esfuerzos en investigación e inversión industrial es la depuración de los efluentes.

Los aceites y grasas son sustancias de origen vegetal o animal, que consisten predominantemente en mezclas de ésteres de la glicerina con los ácidos grasos, es decir, triglicéridos.

Los cuerpos grasos para consumo humano, tanto aceites como grasas, provienen de tres fuentes:

- a)animales terrestres
- b)animales marinos
- c)vegetales

El curso se ha centrado fundamentalmente en la obtención de aceites vegetales, así como su posterior transformación y depuración de efluentes. Las grasas vegetales se pueden dividir en dos grupos:

Aceites de frutos: representan el 20% del total. Los frutos de mayor importancia son la oliva y la palma, y últimamente el aguacate.

Aceites de semillas: representan el 80% de los aceites de uso comestible ya que la variedad de semillas es muy grande. Se pueden consumir directamente, previa refinación (girasol y maíz), o bien ser usados en mezclas como aceites de frituras, para la fabricación de margarinas, etc.

En los distintos tipos de aceites se estudia la composición en los distintos ácidos grasos, pudiendo distinguir los siguientes subgrupos:

1.º *Aceites con gran contenido en ácido láurico(C12:0) y mirístico (C14:0)*

Destacan el aceite de semilla de palma y de coco. Pueden utilizarse para obtención de margarinas, al tener punto de fusión entre 20-30°C.

2.º-Aceites con gran contenido en palmítico(C16:0) y esteárico (C18:0)

Destaca la manteca de cacao, con gran aplicación para chocolates, supositorios, etc.

3.º-Aceites con gran contenido en ácido palmítico (C16:0)

Destacan los aceites de semilla de algodón, de germen de maíz, de germen de trigo y de calabaza. El aceite de algodón contiene gossypol, un producto tóxico que se elimina durante el refino. El aceite de germen de trigo posee un alto contenido en tocoferol, que es antioxidante y precursor de la vitamina E por lo que es muy nutritivo.

4.º-Aceites con bajo contenido en palmítico(C16:0) y alto en oleico(C18:1)

Destacan los aceites de girasol, soja, cacahuete, sésamo, cártamo, colza y linaza que, excepto los dos últimos, se dedican a uso alimentario. El aceite de linaza tiene un gran contenido en ácido linolénico que se oxida (se enrancia) fácilmente, por lo que se dedicaba a pinturas y barnices. Hoy se dedica a margarinas tras someterlo a hidrogenación.

Vista la composición y clasificación de los principales aceites vegetales, se estudió el proceso de obtención de aceite a través de los frutos o semillas, centrándonos en la producción de aceite de oliva (aceite de fruto) y aceite de soja (aceite de semilla). Un esquema general del proceso extractivo y del tratamiento posterior del aceite (refino, hidrogenación) y los efluentes del proceso (alpechín, alpeorujo) se muestra en el esquema de la página siguiente.

La primera línea, representa el aprovechamiento directo del aceite extraído de frutos o semillas. La extracción de aceite de semillas se realiza generalmente mediante un acondicionamiento físico previo de la semilla seguido de una extracción con disolvente orgánico, generalmente hexano, ciclohexano etc. Se requiere un tratamiento posterior de recuperación del disolvente extractor, obteniendo una fase oleosa limpia de hexano.

Si partimos de la aceituna, la segunda línea muestra los distintos aprovechamientos del aceite de oliva. La extracción se viene realizando tradicionalmente por prensado, si bien esta práctica se ha sustituido en la actualidad por la centrifugación, operación que ofrece mayor rendimiento extractivo y evita la formación de malos olores por fermentaciones no deseadas entre los capachos.

La centrifugación desarrollada en un principio daba lugar a tres fases, el aceite, el alpechín y el orujo. El aceite pasa directamente a consumo directo o bien puede sufrir transformación (hidrogenación o refino) para obtener otros productos (margarinas). El orujo es la fase sólida consecuencia de la centrifugación, y se somete a secado siendo una importante fuente de nitrógeno (alimentación animal). Con respecto al alpechín, es una fase líquida residual que anteriormente se vertía directamente, con una DQO importante. La normativa medioambiental

prohibió su vertido directo debiendo someterse a depuración, o bien aprovechamiento como materia prima para la síntesis de otros compuestos (furfural, por ejemplo). Este problema se ha subsanado mediante el uso de la centrífuga de dos salidas, desarrollada a partir de 1990, de la que se obtienen dos fases, el aceite y el alpeorujo.

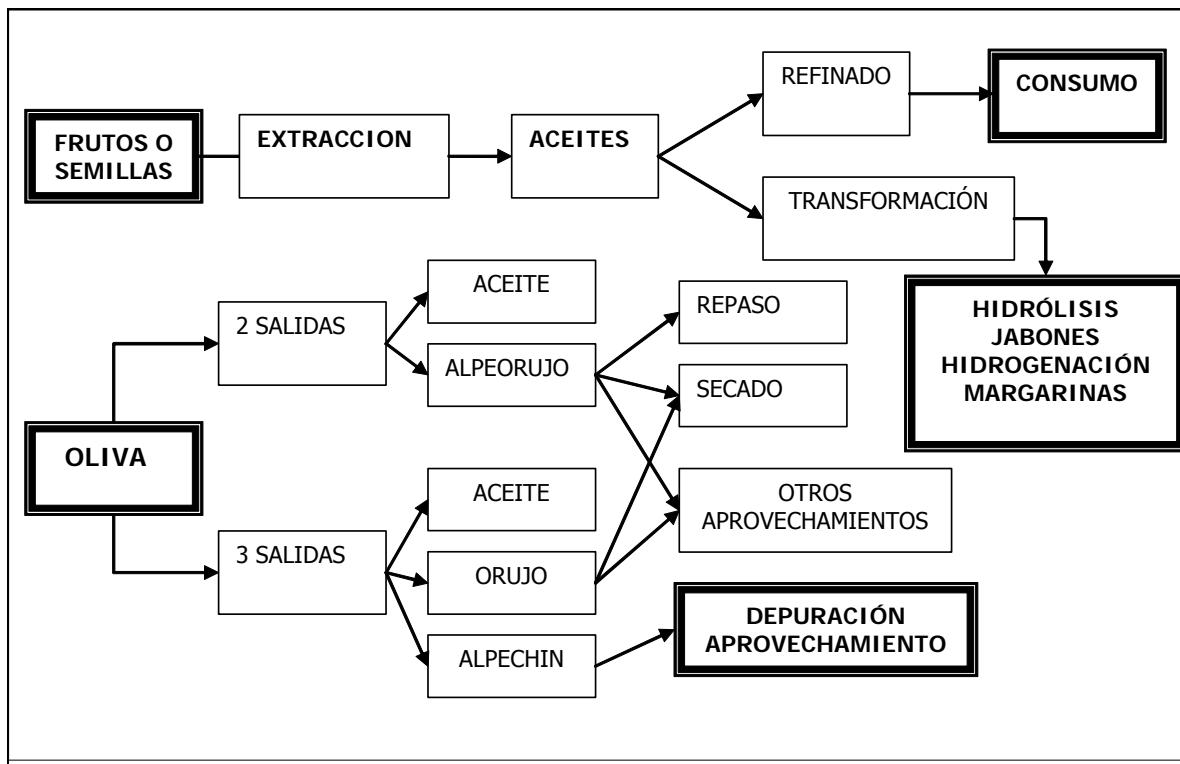


Figura 2. Distintas líneas de aprovechamiento de los aceites de oliva y semillas.

BIBLIOGRAFÍA

Barranco D.; Fernández-Escobar R.; Rallo L.; *El cultivo del olivo*. Junta de Andalucía-Mundiprensa (1997).

Bernardini, E. *Química y Tecnología de las Grasas*. Editorial Alhambra, Madrid (1983).

Boskou J. *Química y Tecnología del Aceite de Oliva*. . AMV Ediciones, Madrid (1988)

Denise, J. *Le reffinage des corps gras*. Whestoek Editions. Les editions des Beffrois. Paris (1982)

Fahran, F.M. y Rahmati, H.: J.A.O.C.S. 65, 1961-2 (1988)

Ferreira, J.; García, A. *Ensayos de pulverizaciones con diversos productos para facilitar la recolección de la aceituna*. III Conferencia Internacional de Técnicos Oleícolas. (1971).

Giametta, G.; Humanes, J. *Recolección mecánica de aceituna. Estado actual del problema*. Proyecto Regional para la Mejora de la Olivicultura. P.N.U.D. –F.A.O

Graciano, E y col. *Grasas y Aceites* , 42, 286-92(1991)

Martínez Nieto, L. *Aprovechamiento integral de los residuos del olivar en “Los Residuos Industriales. Entre el reto y la oportunidad”*. Editorial Síntesis. Madrid (2002).

Martínez Nieto, L. *Composición y Refinación de aceites en “Aceite de Oliva nuestro patrimonio alimentario”*. Vol I..Editorial Puleva Food y Universidad de Granada. Granada (2001).

Porras Piedra A. *Olivar y sus derivados*. Colección de estudios de la U.C.L.M. Ciudad Real (1995).

CONTROL ESTADÍSTICO DE CALIDAD

PROFESORES

Dr. Bravo Rodríguez, Vicente

Dr. Luzón González, Germán

Dra. García López , Ana Isabel

RESUMEN DEL CURSO

El presente curso de doctorado se estructura en tres partes diferenciadas:

- *Control estadístico de calidad.* Esta primera parte, impartida por Dra. Ana Isabel García López, estudia el control de calidad de variables estadísticas, mediante el programa STATT-GRAPHICS.
- *Cinética enzimática.* Impartida por Dr. Vicente Bravo Rodríguez. Se analizan varios artículos relacionados con la reacción de hidrólisis de celulosa, catalizada por varios enzimas.
- *Diseño de experimentos.* Impartida por Dr. Germán Luzón González. Se estudiaron los fundamentos de programación VPA de macros, aplicándose a algún experimento en concreto.

CONTROL ESTADÍSTICO DE CALIDAD. Las técnicas estadísticas de control de calidad se desarrollaron inicialmente para procesos industriales, si bien son válidas para cualquier proceso. El control de calidad se clasifica en:

- Control en curso de fabricación (de procesos).
- Control de recepción y de producto acabado.

El control en curso de fabricación se realiza continuamente durante la fabricación del producto, a intervalos de tiempo fijos, y tiene por objeto vigilar el funcionamiento del sistema en las mejores condiciones posibles y recoger información para mejorarlo.

El control de calidad se realiza observando en cada elemento:

1.- Una característica de calidad medible (longitud, resistencia, contenido de impurezas, etc.), que se compara con un estándar fijado. Se denomina entonces *control por variables*.

2.-Un atributo o característica cualitativa que el producto posee o no (como el control pasa/no pasa, por piezas defectuosas, etc). Se denomina entonces *control por atributos*.

3.-El número total de defectos. Se denomina entonces *control por número de defectos*.

En todo proceso se puede definir una medida de su capacidad para cumplir con las especificaciones de calidad. Para ello medimos la variabilidad de una característica determinada del producto. Si esta característica sigue una distribución normal cuando el proceso está bajo control, todas las unidades fabricadas en condiciones de control (exactamente el 99,7%), se encuentran en un intervalo de amplitud 6σ , siendo σ la desviación típica de la distribución normal que define la fabricación. A este intervalo se le denomina *intervalo de tolerancias naturales o intrínsecas del proceso*.

En procesos en funcionamiento, determinar la capacidad equivale a estimar la desviación típica de la distribución de la fabricación. Para ello se tomarán muestras de su producción en condiciones estándar, tratando de eliminar las causas asignables de variación, de manera que las muestras correspondan a un proceso en condiciones de control estadístico.

Es conveniente tomar varias muestras pequeñas igualmente espaciadas a lo largo del intervalo de producción (cada hora, dos horas, día...). Tomaremos k muestras, de n elementos cada una. Para cada muestra calcularemos las siguientes variables:

- *Media* cada muestra. A partir de aquí, la media de las k medias muestrales.
- *Desviación típica* de cada muestra. A partir de este valor, media de las k desviaciones típicas obtenidas.
- *Rango de cada muestra*, entendido como la diferencia entre el mayor y el menor valor de la muestra. Podremos calcular así el rango medio.

Tabla 1. Principales gráficos utilizados para el control de calidad.

Gráfico	Variable	Línea central	Límites
Medias	Desviaciones típicas	Media de las medias $\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{X}} \pm \frac{3\bar{S}}{\sqrt{nc_2}}$
Medias	Rangos	Media de las medias $\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{X}} \pm \frac{3\bar{R}}{\sqrt{nd_2}}$
Desviaciones típicas	Desviaciones típicas	Desviación típica media \bar{S}	$B_3 \bar{S}, B_4 \bar{S}$
Rango	Rango	Rango medio \bar{R}	$D_3 \bar{S}, D_4 \bar{S}$

Estando los parámetros B_3 , B_4 , D_3 , D_4 tabulados en función del tamaño de muestra y variable a medir (rango o desviación típica).

Ciertas características de calidad no están ligadas a ninguna variable numérica, sino a un atributo que el producto puede o no poseer, por la ejemplo la presencia o no de defectos. El control por atributos se estudia mediante dos gráficos:

Gráfico p. La variable a estudio es la proporción de defectos de cada muestra. Es preferible para muestras de distinto tamaño n.

Podremos así construir un gráfico donde para cada muestra calculemos el valor de proporción de defectos p , de modo que la línea central de dicho gráfico sea la media de dichas proporciones de defectos, \hat{P} , presentando dos límites verticales

$$\text{en } \hat{p} \pm 3\sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}$$

Gráfico np. La variable a estudio es en este caso el número total de defectos. Es más simple que el anterior, pero sólo se puede utilizar en muestras de igual tamaño.

En el gráfico equivalente la línea central será el número medio de piezas defectuosas $c = n\hat{p}$, presentando dos límites verticales en $c \pm 3\sqrt{c}$

CINÉTICA ENZIMÁTICA.

En esta segunda parte se comentaron 4 artículos sobre cinética enzimática

- *Tratamiento de los datos de cinética enzimática.* Se propone un procedimiento para deducir la ecuación de velocidad correspondiente a un mecanismo dado, basado en al aplicación de la aproximación de estado estacionario a todos los complejos intermedios en los que interviene la enzima. Para el ajuste de las velocidades iniciales de reacción a las ecuaciones obtenidas se propone un método en el que se determinan los valores iniciales de los parámetros cinéticos por regresión múltiple y a continuación se mejoran por regresión no lineal.
- *Influencia de la temperatura en la hidrólisis de celobiosa por β-1-4-glucosidasas de A.Níger.* Se han llevado a cabo varios estudios experimentales relativos a la hidrólisis de celobiosa dentro del rango de temperaturas de 40°C a 70°C a pH 4,9 mediante el uso de β-1-4-glucosidasas procedentes de *Aspergillus Níger*. A 70°C se ha constatado una desactivación significante de enzima, que podemos ajustar a un modelo del tipo potencial con $n=1,09$ y $k_d=0.1564(g/l)^{-0.09}\text{min}^{-1}$ donde la velocidad de hidrólisis se puede ajustar a una ecuación de Michaelis-Menten. Entre 40°C y 60°C se constató inhibición de sustrato, así como que el complejo triple SES (sustrato-enzima-sustrato) contribuye a la formación de producto.
- *Influencia del pH sobre los parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de celulosa con Novozym 188.* Partimos del mismo sustrato y enzima que el artículo anterior, con un rango de pH entre 3.65-5.5, y una temperatura

constante de 50°C. Se ha determinado que a valores de pH de 3.65, 4.3 , 4.9 y 5.5, el ajuste experimental de los datos de conversión superiores al 25% debe tener en cuenta la inhibición de producto. Dicha inhibición tiende a crecer con el pH, dentro del intervalo entre 4.3-5.5, siendo el pH óptimo para la hidrólisis de celulosa con Novozym 188 de 4.3

- *Cinética de la Isomerización de Fructosa a Glucosa con Sweetzyme* Este artículo presenta los resultados de un estudio sobre la isomerización de fructosa a glucosa mediante una glucosa-isomerasa inmovilizada, la Sweetzyme A, a 60°C, con una concentración inicial de fructosa entre 0.1 y 2M. En el estudio cinético, los efectos del transporte interno y externo se tuvieron en cuenta, encontrándose que cuando se ajustaban los datos a una cinética de pseudo primer orden, la reacción no enzimática no puede despreciarse a bajas concentraciones de enzima y elevadas concentraciones de sustrato. En este caso la constante de la reacción cinética se puede calcular, estimándose tanto K_m como r_m de la ecuación de Michaelis-Menten. También se estudió la influencia del transporte interno, evaluándose la difusividad hacia el interior de los poros.

DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

Se estudian los fundamentos de la programación VBA, para creación de macros y su aplicación a un caso concreto.

Al estudiar programación VBA, se aplican una serie de comandos directamente ejecutables a través de Excel. Si no se conoce la sintaxis de un comando determinado, se puede obtener la secuencia del mismo grabando la acción directamente desde el programa Excel. Para ello seleccionamos en el menú herramientas → macro → grabar macro. Podemos ejecutar la acción deseada desde el programa Excel (por ejemplo aplicar una fórmula a una celdilla seleccionada), obteniendo la secuencia de comandos correspondientes al programa VBA.

El uso de macros está justificado cuando se van a llevar a cabo una serie de cálculos con frecuencia, pudiendo programar una macro que realice todo el proceso y grabarla para su uso cuando sea necesario.

Se nos propuso crear una macro de uso específico para algún problema en concreto. En mi caso , diseñé una macro para llevar a cabo un ajuste experimental de datos cinéticos a un polinomio de grado 7, con posterior representación gráfica de los datos experimentales y la curva teórica.

Los datos se tomaron de un experimento con el Titrino, correspondientes a una hidrólisis de lactosuero con un preparado enzimático (Protex 6L), a 50°C y pH 8.50, donde se obtuvieron datos del grado de hidrólisis en función del tiempo, con un seguimiento de dos horas.

BIBLIOGRAFÍA

Bravo V., Paez M.P., Aoulad M., Reyes A. *The influence of temperature upon the hydrolysis of cellobiose by β -1-4-glucosidases from Aspergillus niger.* Enzyme and Microbial Technology (1999).

Bravo V., Paez M.P., Aoulad M., Reyes A, García López A.I. *Aplicación del método integral en la hidrólisis enzimática de celobiosa.* Afinidad (2001)

Bravo V., Paez M.P., Aoulad M., Reyes A *Influencia del pH sobre los parámetros cinéticos de la hidrólisis enzimática de celulosa con Novozym 188.* Afinidad 2001

Bravo V., Paez M.P., Aoulad M., Reyes A *Cinética de la isomerización de Fructosa a Glucosa con Sweetzyme A.* Afinidad 2001

Camacho Rubio F., Bravo Rodríguez V., Páez-Dueñas M.P. *Tratamiento de los datos de cinética enzimática.* Afinidad (1988)

CATÁLISIS ENZIMÁTICA EN MEDIOS NO ACUOSOS. LÍPIDOS ESTRUCTURADOS

PROFESOR:

Camacho Rubio, Fernando

RESUMEN DEL CURSO:

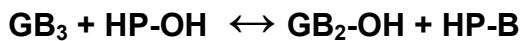
El curso se estructura en dos partes bien diferenciadas:

- Influencia de la naturaleza del disolvente en la reacción enzimática.
- Obtención y aplicaciones de los lípidos estructurados.

A.-*Influencia de la naturaleza del disolvente.*

Se parte de los trabajos de Zaks y Klibanov, publicados en 1984 en la revista Science, donde se estudian las posibilidades de utilización práctica de las enzimas en medios no acuosos, o mejor dicho microacuosos, porque una pequeña cantidad de agua, ligada a la enzima, es siempre necesaria para mantener la actividad enzimática.

En este trabajo con lipasa pancreática porcina, utilizando una solución 2 M de n-heptanol en tributirina, encuentran que la velocidad de alcoholisis cambia con el contenido en agua de la mezcla de sustratos, siendo la enzima activa incluso con un contenido en agua del sistema, sustratos más enzima, inferior al 0.02% en peso, aunque su máxima actividad para la reacción citada la presenta a un contenido en agua del orden de 0.8% en peso.



También analizan los autores citados la estabilidad térmica de la enzima a 100°C, una temperatura a la que esta lipasa pancreática en disolución acuosa se desnaturaliza completamente en tiempos del orden de 1 segundo, pudiendo constatarse que la estabilidad térmica de la enzima aumenta considerablemente, sobre todo para el contenido en agua menor para el cual resulta una vida media de la enzima a 100°C superior a 5 horas.

Desde estos trabajos pioneros que pusieron de manifiesto la importancia de la polaridad del disolvente y del contenido de agua ligada al enzima en la reacción, se ha progresado mucho en la catálisis enzimática en ambientes microacuosos, fundamentalmente con lipasas. Hoy día, se dispone lipasas inmovilizadas por adsorción sobre soportes macroporosos, de tamaño de poro superior a 50nm, dado que el tamaño de estas enzimas oscila generalmente alrededor de 50 Å, y debe preverse que la enzima junto con su agua ligada recubra la superficie del soporte, permitiendo además que exista en los poros un canal de fase orgánica que permita acceder a los sustratos hidrófobos hacia el centro activo de la

enzima. Estos sustratos son moléculas relativamente voluminosas, como triacilgliceroles.

La naturaleza heterogénea de estos sistemas, determina que fenómenos físicos puedan influir de forma apreciable sobre la cinética observada de la reacción. En relación a la razón agua/masa de enzima, se aprecia un óptimo en la velocidad de reacción cuando ésta es de 0.10, anulándose por completo para un valor de 0.5 a 0.6. En el primer caso el agua se distribuye uniformemente junto con el enzima sobre la superficie del soporte. Todos los poros de tamaño necesario para que penetre la enzima permitirán el acceso a la fase hexánica y por tanto al sustrato disuelto en ella. En el segundo caso el agua llenará por completo los macroporos e incluso formará una delgada película sobre la superficie externa de las partículas de enzima inmovilizada que impedirán el contacto de la enzima con los reactivos.

La hidrofobicidad del disolvente se puede determinar de acuerdo al logP, siendo P el coeficiente de partición de una mezcla octanol-agua a 25°C y dilución infinita. Los disolventes se caracterizan atendiendo a este valor en parcialmente hidrófilos ($\log P < 2$), moderadamente hidrófobos ($2 < \log P < 4$), e hidrófobos ($\log P > 4$).

Los disolventes parcialmente hidrófilos son capaces de retirar parte de la película de agua esencial que rodea al enzima, disminuyendo así su actividad, o bien llenan completamente los macroporos del soporte impidiendo que los sustratos hidrófobos penetren y alcancen el centro activo.

Para finalizar esta primera parte del curso, se describió la técnica de la *porosimetría de mercurio*, que permite caracterizar la distribución de tamaño de los poros en los distintos soportes de lipasas utilizados. Mediante un porosímetro medimos la cantidad de volumen de mercurio introducido en los poros bajo diferentes presiones. La presión externa aplicada para llenar un poro de tamaño r se obtiene mediante la ecuación de *Washburn*:

$$P = \frac{2\sigma \cos(\theta)}{r} \quad (1)$$

donde P es la presión aplicada, σ la tensión superficial del mercurio en el poro (480 erg/cm^2), θ el ángulo de contacto del mercurio en las paredes del sólido (140°) y r el radio del poro, supuesto cilíndrico.

Mediante esta técnica se ha obtenido una distribución en el tamaño de poro de las dos lipasas estudiadas, Lipozyme®IM y Novozym®435. La primera presenta dos máximos, en torno a un tamaño de poro de 12 y 30 nm. La segunda presenta un único máximo en torno a radio de poro 30 nm.

B.-Lípidos Estructurados. En general, se entiende por lípidos estructurados los triglicéridos obtenidos por procesos químicos o enzimáticos con una determinada distribución de ácidos grasos en las diferentes posiciones de la glicerina, para conseguir una finalidad concreta. Dado que hasta el momento estas finalidades están dirigidas hacia la nutrición humana los aspectos más importantes son la naturaleza de los ácidos grasos constituyentes y su posición en la glicerina,

distinguiendo entre las posiciones extremas (1 y 3) y la posición intermedia (2), ya que de acuerdo con el conocimiento actual, su absorción intestinal depende de estas posiciones.

Lípidos estructurados al azar, constituidos por ácidos grasos de cadena larga (como el esteárico) y de cadena corta (como el acético, propiónico y butírico), ya se están adicionando a productos alimenticios, por su carácter hipocalórico con respecto a los lípidos utilizados anteriormente. También se utilizan triglicéridos de cadena media, TGM, ácidos grasos saturados del caproico al laurico, para pacientes con insuficiencia pancreática y otros problemas de absorción de lípidos, ya que constituyen una fuente de energía inmediata y concentrada que se absorbe rápidamente a través de la vena porta, de modo que son rápidamente utilizados y es menos probable que se acumulen en el tejido adiposo.

Para aunar ambos efectos (beneficios de los ácidos poliinsaturados de cadena larga y la digestibilidad y menor aporte calórico de los ácidos de cadena media), en la actualidad se trabaja en la obtención de triglicéridos estructurados cuyas posiciones 1 y 3 están ocupadas por ácidos grasos de cadena media y cuya posición dos contiene un ácido graso esencial, de cadena larga, que bien podría ser una ácido graso poliinsaturado (PUFA). Esta distribución MLM (Cadena Media-Cadena Larga-Cadena Media) facilita la digestión de estos lípidos, ya que la lipasa pancreática hidroliza los enlaces de las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos, presentando una mayor actividad cuando estas posiciones están ocupadas por ácidos grasos de cadena media.

La reacción más utilizada para la síntesis de lípidos estructurados es la acidolisis entre triglicéridos naturales ricos en el ácido graso funcional de interés y ácidos grasos de cadena media. Los ácidos grasos de cadena media sustituyen a los ácidos grasos nativos tan sólo en las posiciones 1 y 3, dando lípidos MLM.

Las principales dificultades para obtener altos rendimientos en lípidos estructurados por este procedimiento son :

- Disponer de triacilgliceroles con suficiente cantidad del ácido graso funcional de interés en la posición 2. Si se pretende que los ácidos grasos funcionales que ocupen la posición 2 sean PUFAs debe partirse de aceites de pescado o de aceites de microalgas marinas.
- Encontrar lipasas 1,3 específicas con una actividad alta e inmovilizarlas eficazmente a un soporte macroporoso adecuado.
- Evitar las migraciones de grupos acilo desde las posiciones 1 y 3 hasta la posición 2 durante la reacción.

Los lípidos estructurados pueden suponer un salto cuantitativo para mejorar la dieta mediante la reducción del consumo de calorías aportadas por las grasas, además de mejorar nuestra salud gracias a las propiedades de los ácidos grasos esenciales. Sin embargo, para que esto ocurra aun ha de investigarse mucho en la síntesis de estos lípidos estructurados, subsanar los inconvenientes anteriormente citados en la reacción de acidolisis y adaptar la producción a la escala industrial.

BIBLIOGRAFÍA

Colja Laane, Sjef Boeren, Kees Vos, Cees Veeger. *Rules for optimization of Biocatalysis in Organic Solvents.* Biotechnology and Bioengineering, vol 3, 81-87 (1987).

Kamat S., Critchley G., Beckman E. *Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids.* Biotechnology and Bioengineering (1987).

Kellogg G.E., Abraham D.J. *Hydrophobicity: is LogP_{o/w} more than the sum of its parts?* European Journal of Medical Chemistry (2000)

Klibanov A.M., *Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents.* Accounts of Chemical Research (1990).

Zaks A., Klibanov A.M., *Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents.* Journal of Biological Chemistry (1988).

Zaks A., Klibanov A.M. *Enzyme-catalyzed Processes in Organic Solvents.* Biotechnology and Bioengineering (1985).

TECNOLOGÍA DE PREPARACIÓN DE EMULSIONES Y DISPERSIONES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

PROFESORES

Dra. Jurado Alameda, Encarnación

Dr. Luzón González, Germán

Dra. Fernández Serrano, Mercedes

RESUMEN DEL CURSO

Entendemos por sistema disperso al formado por dos o más fases, estando subdivididas alguna de ellas en partículas discretas y dispersadas en el seno de la otra. En función de la naturaleza de cada fase tendremos:

Tabla 2. Nomenclatura de los distintos sistemas dispersos-

FASE CONTINUA	FASE DISPERSA	SISTEMA DISPERSO
Gas	Gas	No existe
Gas	Líquido	Niebla
Gas	Sólido	Humo
Líquido	Gas	Espuma
Líquido	Líquido	Emulsión
Líquido	Sólido	Dispersión
Sólido	Gas	Espuma sólida
Sólido	Líquido	Emulsión sólida
Sólido	Sólido	Dispersión sólida

Los sistemas dispersos con fase continua gas, nieblas y humos, se caracterizan por presentar un tamaño de partícula inferior a 5 micras. Sus aplicaciones son varias, como sprays, humidificadores, cosmética, inyección de combustible, etc.

Los sistemas dispersos con fase continua líquido pueden ser espumas, emulsiones o dispersiones. En el primer caso deberemos tener en cuenta el Factor de Expansión, relación entre el volumen de espuma y el volumen de líquido inicial. Las emulsiones se realizan entre dos fases inmiscibles, generalmente una fase acuosa polar (W) y otra fase oleosa (O). Sus aplicaciones

en alimentación, cosmética y farmacia son varias. Por último las dispersiones suelen tener tamaño de partícula del orden de los coloides, de 1nm a 1μm. Son de aplicación para pinturas, tintes, cosméticos , etc.

Con respecto a los sistemas dispersos con fase continua sólida, son de destacar las espumas y geles. Las primeras se forman al solidificar rápidamente la fase continua no dejando escapar el gas encerrado en su interior. En el segundo caso se parte de una dispersión en la que se establece mediante uniones Van der Waals una red tridimensional entre las partículas del sistema.

Estos sistemas dispersos son inestables, tendiendo a separarse las distintas fases entre sí. Las principales causas de desestabilización de sistemas dispersos son las siguientes:

- *Difusión*. Fuerza impulsora debida a la diferencia de presiones, se produce una difusión de los componentes de la gota más pequeña a la más grande.
- *Sedimentación o creaming*. Las gotas o partículas caen por acción de la gravedad a una velocidad terminal que será menor cuanto menor sea el tamaño de las partículas.
- *Floculación*. Dos o más partículas se unen conservando su entidad pero formando agregados.
- *Coalescencia*. Se produce en gotas líquidas y espumas, las partículas se unen formando una sola partícula de mayor tamaño.

Los dos primeros fenómenos dependen del tamaño de la partícula, de modo que si dotamos a las partículas de un tamaño homogéneo lo más pequeño posible podremos estabilizar el sistema. En los dos últimos casos juega un papel fundamental la carga electrostática que presenta la superficie de la partícula. Dicha carga depende de la naturaleza del medio, la naturaleza polar de grupos químicos de superficie, y la presencia de otros componentes en solución.

Para estabilizar el sistema disperso en estos casos es necesario el uso de tensioactivos, sustancias que se sitúan en la interfase de separación entre la partícula y la fase continua, de modo que evitan que las partículas de las dispersiones puedan unirse entre sí.

Por su naturaleza los tensioactivos pueden ser:

- *Catiónicos*. Éstos están compuestos por una parte hidrofóbica (cadena lineal hidrocarbonada formada por C₁₂-C₁₈ átomos de carbono o dos cadenas lineales de C₈-C₁₈ átomos de carbono) y otra parte hidrofílica cargada positivamente, constituida por uno o varios grupos de sales de aminas. El grupo amino les confiere una solubilidad elevada. No tienen buen poder espumante, pero son muy afines a las proteínas y en particular a la queratina, siendo buenos acondicionadores capilares
- *Aniónicos*. Poseen carga neta negativa. Recubren la superficie de las partículas evitando que éstas se unan al existir repulsión electrostática. Destacan las sales de ácidos sulfónicos y ésteres del ácido sulfúrico. Se

usan en agentes de limpieza y tienen poder espumante elevado, siendo aptos para champús, geles, etc.

- *Anfóteros.* Están caracterizados por una estructura molecular que contiene dos grupos funcionales diferentes. Uno con carácter aniónico y otro con carácter catiónico. La función aniónica de los anfóteros es generalmente un carboxilato. La función catiónica es un grupo amino. También están presentes grupos éter o hidroxilo con objeto de incrementar la hidrofilicidad de la molécula.
- *Neutros.* A diferencia de los aniónicos o catiónicos no se disocian en iones hidratados cuando se disuelven en agua. Las propiedades hidrofílicas son proporcionadas por los puentes de hidrógeno que se establecen, entre grupos hidroxilo, oxígeno, amida o amina. Dentro de estos tensioactivos los grupos más utilizados en el ámbito de la cosmética son las alcanolamidas, los derivados oxietilenados y los ésteres de polioles. Crean una espuma compacta y cremosa, y tienen elevado poder desengrasante y emulsionante.

En una segunda parte del curso se estudió con más detalle la elaboración industrial de emulsiones. Se deben tener en cuenta varias etapas:

- *Preparación de las fases.* Se debe asegurar que en la fase grasa estén todos los componentes disueltos o dispersos. La temperatura debe ser tal que al mezclarse las fases no se produzca precipitación. Se debe dotar de una agitación suficiente en ambas fases, eligiendo el tipo de agitador adecuado para cada caso.
- *Emulsificación.* Mezcla íntima de las fases añadiendo lentamente una de ellas sobre la otra bajo condiciones de agitación térmica. Existen dos métodos: método continental, cuando se añade la fase acuosa sobre la grasa, y método inverso, la grasa sobre la fase acuosa.
- *Estabilización.* Se consigue con tamaños de partículas lo más pequeño posible y con una distribución homogénea. Para homogeneizar sometemos a las gotas a esfuerzos de cizalladura suficientemente intensos como para dividirlos y alcanzar un tamaño adecuado.,
- *Enfriado.* Cuando la emulsión ha alcanzado el grado de dispersión necesario se debe enfriar a temperatura ambiente. En esta fase se incorporan las materias activas (vitaminas, perfumes, aromas,...) que se alterarían a altas temperaturas.
- *Desaereación.* Una vez estabilizada la emulsión se debe eliminar la mayor cantidad de aire posible, que podría causar alteración de la emulsión por oxidación de algún componente.

BIBLIOGRAFÍA

- Becher P. *Emulsiones: Teoría y Práctica*. Editorial Blume, Madrid (1972).
- Davidsohn A.S. & Milwidsky B. *Synthetic Detergents*. Ed. Logman Scientific & Technical (1987).
- Jungerman E., Editor. *Cationic Surfactants*. Marcel Dekker, New York.
- McCuntcheon. *Detergents and Emulsifiers*. McCutcheon División Pub. Co. 175 Rock Roan Glen Rock NJ 07452 .
- Preparación de emulsiones*. Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica. Universitat de Valencia.

TECNOLOGÍA Y APLICACIONES DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

PROFESORES

Dr. Tello González, Pedro

Dra. Guadix Escobar, Emilia

RESUMEN DEL CURSO

La hidrólisis enzimática de alimentos tiene como misión mejorar las características químicas, físicas y organolépticas del alimento original, sin detrimento de su valor nutritivo.

En comparación con los métodos tradicionales (hidrólisis ácida y alcalina), la hidrólisis enzimática ofrece indudables ventajas:

- *Selectividad.* No existen procesos de degradación del sustrato ya que las enzimas son selectivas para un tipo de enlace.
- *Operación a pH y Temperaturas moderadas.* A diferencia de los métodos tradicionales los pH están comprendidos entre 5-8 y las temperaturas entre 40-60°C.
- *Mantiene o mejora el valor nutritivo.* La hidrólisis alcalina destruye, en la hidrólisis de proteínas, los aminoácidos arginina y cisterna, mientras que la hidrólisis ácida hace lo mismo con el triptófano.
- *No añade sustancias extrañas al medio.* Después de una hidrólisis ácida o alcalina es necesario neutralizar y por tanto se eleva apreciablemente el contenido en sales.
- *Separación o desnaturalización de la Enzima.* La desnaturalización de la enzima se lleva a cabo mediante métodos térmicos, mientras que su separación de la mezcla de productos se realiza mediante columnas de carbón activo o módulos de ultrafiltración.

Con respecto al modo de operación, podemos trabajar en condiciones de fase homogénea, donde el enzima se disuelve en la disolución inicial de reactivos, o bien en fase heterogénea, con la enzima fijada a un soporte poroso. La fijación de la enzima al soporte se puede llevar a cabo por métodos físicos (adsorción, oclusión o encapsulación) o bien métodos químicos que pretenden la fijación al soporte por medio de enlaces covalentes o copolimerización.

Como aplicaciones de la hidrólisis enzimática se han estudiado las siguientes:

a.-Hidrólisis del almidón. Isomerización de glucosa a fructosa para producción de jarabes de fructosa (HCFS). Producción de cereales hidrolizados.

b.-Hidrólisis de pectinas y de celulosa para preparación de zumos de frutas.

c.-Hidrólisis enzimática de lactosa en leche y lactosuero.

d.-Hidrólisis de proteínas, a la que se dedicó la segunda parte del curso.

A.-Hidrólisis de almidón. El almidón se encuentra constituido por dos componentes principales:

Amilosa. Formado por cadenas lineales de glucosa anhidra unidas por enlaces α - (1,4). Representa el 15-25% del almidón.

Amilopectina. Constituido por cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces α - (1,4) , de la que parten ramificaciones unidas a la cadena lineal por enlaces α - (1,6). Representa entre el 85%-75% del almidón.

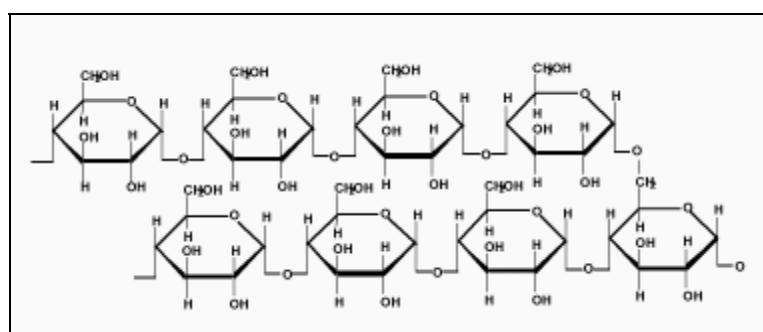


Figura 3. Estructura de la amilopectina.

De acuerdo con esta estructura, se hace necesario el uso de enzimas específicas para el enlace α -(1,4) y α -(1,6) . Entre ellas destacamos tres:

α -amilasa, específica para el enlace α -(1,4) y que como productos de hidrólisis da maltodextrinas (cadenas de 2 a 7 unidades de glucosa).

Pululanasa, específica para el enlace α -(1,6), que da como productos terminales dextrinas en forma de cadenas lineales.

Amiloglucosidasa, ataca tanto los enlaces α -(1,4) como los α -(1,6), de modo que llega a una hidrólisis completa dando unidades de glucosa.

Los productos de la hidrólisis del almidón se utilizan en varias aplicaciones:

Producción de jarabes de glucosa. Con una primera etapa de hidrólisis con α -amilasa para dar maltodextrinas, que posteriormente tras separación del enzima se someten a una segunda hidrólisis (etapa de sacarificación) con *amiloglucosidasa* para dar glucosa que concentraremos en evaporador hasta obtener el jarabe de glucosa al 95%.

Producción de jarabes de fructosa. Los jarabes ricos en fructosa (HFCS) tienen un menor aporte calórico y un mejor poder edulcorante e higroscópico. Partiendo del jarabe de glucosa, catalizamos una reacción de isomerización de glucosa a

fructosa mediante el enzima *glucosaisomerasa*, en un reactor tipo columna. Esta reacción es reversible obteniéndose un 42% de fructosa y un 50% de glucosa. Tras eliminar la enzima y ablandar el contenido en sales, concentraremos por evaporación obteniendo el jarabe.

Cereales hidrolizados. Al método tradicional de tostación de la harina y posterior secado se le añade el método enzimático, que mejora la digestibilidad de los cereales al obtener productos de menor tamaño molecular. La harina tostada se introduce en un reactor tanque agitado junto con una mezcla de enzimas (α -amilasa, pululanasa...), obteniendo como productos hidrolizados una mezcla de dextrinas. Estos productos requieren menor cantidad de sacarosa añadida para mejorar su sabor, así como una desactivación térmica posterior de las enzimas. Una fracción de estas dextrinas se puede sacrificar y posteriormente llevar a un reactor de isomerización enzimática para obtener fructosa que por mezcla con la corriente inicial aumente su poder edulcorante.

B.-Hidrólisis de pectinas y de celulosa para preparar zumos de frutas.

Las pectinas y la celulosa forman parte de la pared celular de los tejidos de las plantas y son los constituyentes principales de la pared primaria de las células y de las lamelas medias que las separan.

La hidrólisis de pectinas se lleva a cabo con pectinonas, generalmente obtenidas a partir de cepas sumergidas de *Aspergillus Níger*. Con respecto a la hidrólisis de la celulosa, recurrimos a las celulasas, formadas por complejos enzimáticos de tres enzimas: *endo- β (1,4) glucanasa*, *exo- β (1,4) glucanasa*, y *β (1,4) glucosidasa*.

Los tratamientos enzimáticos con pectinonas y en su caso con celulasas pretenden:

Aumentar el rendimiento de la extracción por digregación de pectinas y celulosa el rendimiento en zumo puede aumentar entre 6-10% y la capacidad de prensado entre 10-50%. Los beneficios netos se estiman entre 5-20 €/Tm.

Clarificar y estabilizar los zumos obtenidos. El tratamiento enzimático durante la clarificación elimina pectinas, celulosa, proteínas, taninos...

C.- Hidrólisis enzimática de lactosa en leche y lactosuero.

La lactosa es un dímero formado por una molécula de glucosa y otra de galactosa. Es el carbohidrato principal de la leche y del suero láctico.

La hidrólisis de la lactosa nos interesa por varios motivos:

- (1) Mejora nutricional. Puesto que se evita la intolerancia a la lactosa.
- (2) Se evita la cristalización de la lactosa al preparar leches concentradas.

El lactosuero es un efluente con una importante DBO, que se reduce considerablemente mediante la hidrólisis de la lactosa, ya que glucosa y galactosa son fácilmente biodegradables.

Como enzimas utilizamos lactasas, generalmente obtenidas a partir del *Aspergillus Oryzae*, generalmente en columnas de enzima inmovilizada. Al poseer éstas una temperatura óptima entre 30-60°C, es necesario una etapa previa de intercambio de calor.

El suero deslactosado posee aplicaciones en bebidas, jarabes y alcohol.

D.-Hidrólisis de proteínas.

Una de las aplicaciones más importantes de los hidrolizados de proteínas es su utilización como fuente de nitrógeno en la formulación de dietas enterales con destino a la alimentación infantil y/o adultos enfermos. Estas dietas entéricas se diseñan para ser absorbidas en el intestino sin una digestión previa en el estómago y son esenciales en el tratamiento de pacientes con desórdenes estomacales o problemas de la mucosa intestinal, así como lactantes con síntomas de malabsorción-malnutrición por causas alergénicas.

Las características que deben cumplir estos hidrolizados de proteínas para formar parte de una dieta enteral son:

- Que sean osmóticamente equilibrados.
- Que sean hipoalergénicos.
- Presentar un alto valor nutritivo, comparable al de la proteína de partida.
- Tener un sabor agradable.

La elección de la fuente proteínica a utilizar en el proceso de hidrólisis se realiza en función del uso final que vaya a tener el hidrolizado y del valor añadido conseguido con respecto al sustrato de partida. Así, para la obtención de hidrolizados con propiedades gelificantes y emulsificantes se suelen emplear colágeno y gelatina por su capacidad para formar geles transparentes, mientras que cuando se busca obtener una fuente de nitrógeno se usan proteínas de pescado y proteínas microbianas en alimentación animal, y proteínas de soja y lácteas en alimentación humana, siendo éstas últimas, especialmente las proteínas del lactosuero, ideales para preparar alimentos infantiles y dietas enterales.

Los hidrolizados proteínicos presentan una serie de propiedades que les confieren mejor calidad con respecto a las proteínas de partida:

- *Mejor solubilidad.* La solubilidad de las proteínas aumenta con el grado de hidrólisis, debido a la reducción en el tamaño molecular y el incremento del número de grupos polares libres.
- *Propiedades emulsificantes.* En general, los hidrolizados adquieren capacidad emulsionante al aumentar el número de grupos polares, disminuir el peso molecular y aumentar la exposición de grupos hidrófobos. Esta tendencia no es continua al aumentar el grado de hidrólisis, existiendo un grado de hidrólisis óptimo en el que la capacidad emulsificante es máxima.

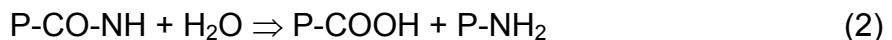
- *Propiedades espumantes.* En general, el aumento en el número de aminoácidos libres y péptidos de pequeño tamaño afectan a las propiedades espumantes de modo adverso. Un hidrolizado que actuara como buen agente espumante necesitaría una distribución estrecha en el tamaño molecular.
- *Alergenicidad.* Una aplicación de los hidrolizados proteínicos es reducir el riesgo de alergenicidad cuando se utilizan proteínas de la leche como sustituto de la leche materna. Existe población alérgica a la β -lactoglobulina, que se encuentra en cantidad importante en la leche de vaca. En general, la disminución del tamaño molecular en la hidrólisis disminuye la alergenicidad.
- *Amargor.* Por el contrario, los productos hidrolizados suelen tener un sabor amargo, debido a la presencia de grupos hidrófobos libres. La presencia de péptidos de 2-15 aminoácidos da productos amargos, de modo que una hidrólisis necesita una separación de los aminoácidos hidrófobos para disminuir el amargor.

Las primeras enzimas proteolíticas (proteasas) utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico.

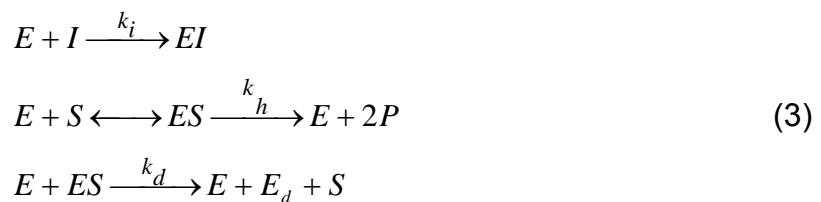
La hidrólisis enzimática de proteínas es un proceso que transcurre a través de un conjunto de etapas en serie:



La proteasa actúa sobre el enlace peptídico, rompiéndolo y liberando el grupo amino y el grupo carboxilo, de acuerdo con la ecuación:



Son escasos los estudios sobre cinética de la hidrólisis proteínica, soliéndose ajustar los datos a cinéticas de Michaelis-Menten, demasiado simples. En el departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Granada se ha estudiado la cinética de la hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero con proteasas comerciales, proponiéndose el siguiente mecanismo de reacción:



Donde la primera etapa muestra un proceso muy rápido con unión irreversible de la enzima activa a un inhibidor presente en el sustrato, disminuyendo la concentración de enzima activa inicial. La etapa intermedia conduce a la formación de producto mientras la última etapa muestra una desnaturización de 2º orden por ataque de la enzima libre a la enzima ligada.

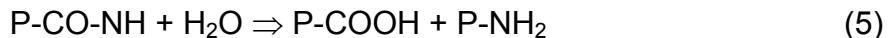
Para el seguimiento y control de la hidrólisis de proteínas es necesario evaluar el grado de hidrólisis, DH, que se define:

$$DH = \frac{n^o \text{ enlaces peptídicos hidrolizados}}{n^o \text{ total de enlaces peptídicos}} \cdot 100 \quad (4)$$

Los principales métodos para medir el DH se basan en :

- *Determinación de nitrógeno soluble.* Tras precipitar la proteína con ácido tricloroacético. En este caso las técnicas más usuales son el método Kjeldhal, la reacción de Biuret o la determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos con grupos aromáticos.
- *Determinación de los grupos α -amino libres.* Para ello puede utilizarse la valoración con formol, aunque presenta gran número de interferencias. También se utilizan para esta medida productos químicos como el ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), ortofenilaldehído (OPA) que reaccionan con los grupos α -amino libres.
- *Valoración del protón: método del pH-estato.* El control de la hidrólisis enzimática de proteínas a pH alcalino puede ser realizado de forma sencilla y precisa por medida del consumo de base necesario para mantener constante el pH en el reactor de hidrólisis. Sin embargo, este consumo no está relacionado de una forma simple con el grado de hidrólisis alcanzado, siendo necesario para establecer esta relación el conocimiento del pK medio de los grupos α -amino liberados en la hidrólisis.

Cuando se hidroliza un enlace amido a pH alcalino, $7 < \text{pH} < 10$:



el grupo carboxilo terminal se disocia por completo:



y los protones formados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonización de los grupos α -amino liberados:



La base agregada para mantener constante el pH neutraliza únicamente los protones, que son a su vez una fracción de los enlaces amino hidrolizados:

$$DH = \frac{V_B N_B}{M_P} \frac{1}{\alpha} \frac{1}{h_{tot}} \quad (8)$$

Siendo V_B , N_B el volumen y normalidad de la base añadida, M_P la masa de proteína α el grado de disociación del grupo amino, que será función del pH y temperatura y h_{tot} el número total de enlaces peptídicos que presenta la proteína.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen J. *Enzymic hydrolysis of food proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York (1995).
- Adler-Nissen y Olsen H.S. *The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy proteins*. ACS Symp. Ser 92: 125-146 (1979).
- Camacho F., González Tello P. y Guadix E.M. *Hidrólisis enzimática de lactoalbúmina*. An. Quím. 568-572 (1992)
- Camacho F., González Tello P. y Guadix E.M. *Influence of enzymes, pH and temperatura on the kinetics of whey protein hydrolysis*. Food Science Techn. Inter. (1998).
- C.F. Jacobsen, J.Léonis, K. Lindestrøm-Lang, y M. Ottesen. *The pH stat and its use in biochemistry*. Meth. Biochem. Anal.(1957)
- González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Páez M.P. y Guadix E.M. *Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic models*. Biotechnology and Bioengineering (1994a).
- González-Tello P., Camacho F., Jurado E., Páez M.P. y Guadix E.M. *Enzymatic hydrolysis of whey proteins: II. Molecular Weight Range*. Biotechnology and Bioengineering (1994b).
- Guadix A. ; Guadix E.M., Páez-Dueñas M.P., González-Tello P., Camacho F. *Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas*. Ars. Pharmaceutica (2000).
- Guadix E.M. *Hidrólisis enzimática de las proteínas del suero láctico*. Ed. Ayala, Madrid (1993).
- .

TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS

PROFESORES

Dr. Tello González, Pedro

Dra. Guadix Escobar, Emilia

RESUMEN DEL CURSO

Las membranas han ganado un importante lugar en la tecnología química y se usan en un amplio rango de aplicaciones. Estos procesos aprovechan la propiedad de las membranas de modificar la permeabilidad de las especies químicas a través de sus poros.

La fuerza impulsora de una operación de separación por membranas es la diferencia de potencial químico entre las dos regiones separadas por la membrana. Dicha diferencia de potencial químico vendrá dada por :

- Una diferencia en actividad
- Diferencia de presión. Es la fuerza impulsora más común.
- Diferencia de potencial eléctrico, aunque éste último sólo actuará sobre componentes con carga eléctrica.

A.-Tipos de operaciones de separación con membranas.

Las cuatro operaciones de membrana provocadas por una diferencia de presión se distinguen por la estructura de la membrana utilizada:

- *Microfiltración.* Membrana con macroporos ($r>50\text{nm}$), permite separar partículas de $0,1 \mu\text{m}$.
- *Ultrafiltración.* Membrana con mesoporos (radio de poro entre 2 nm y 50 nm). Permite separar partículas de $0,01 \mu\text{m}$.
- *Nanofiltración.* Membrana microporosa, que permite separar partículas de $0,001 \mu\text{m}$.
- *Ósmosis inversa.* Membrana densa,.Permite separar partículas de $10^{-4} \mu\text{m}$.

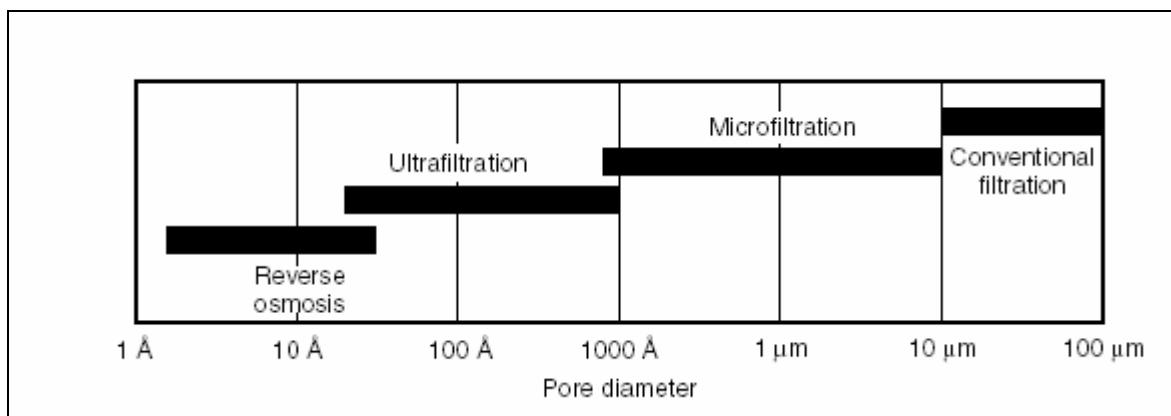


Figura 4. Distintos niveles de filtración.

En la Microfiltración y Ultrafiltración la separación se basa esencialmente en el efecto criba, mientras que en la ósmosis inversa la separación se basa en el mecanismo de disolución-difusión entre los componentes y el disolvente. En la nanofiltración participan ambos mecanismos.

También se utilizan industrialmente las membranas microporosas y densas para la separación de mezclas gaseosas mediante una diferencia de presión, operación que se conoce con el nombre de PERMEADO DE GASES, cuya importancia crece continuamente en el tratamiento de efluentes gaseosos.

La operación basada en una diferencia de potencial eléctrico es la ELECTRODIÁLISIS, requiere la utilización de membranas conductoras de la corriente eléctrica que son membranas microporosas o densas de naturaleza semejante a las resinas de cambio iónico pero moldeadas en forma de láminas.

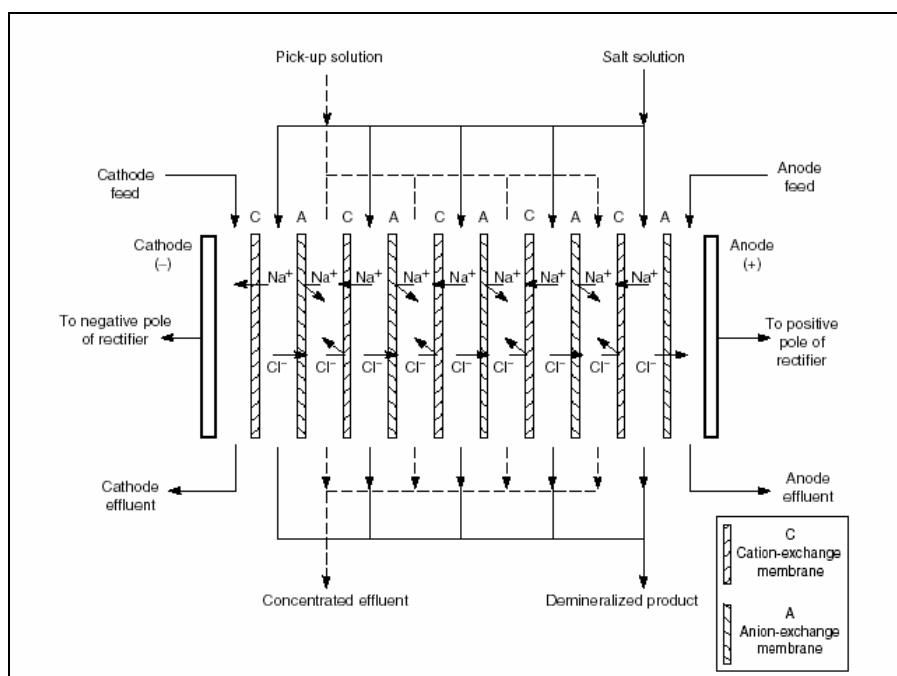


Figura 5. Unidad de electrodiálisis.

Con respecto a operaciones basadas en una diferencia de actividad, son de gran interés industrial, como la diálisis, preevaporación y destilación de membrana.

B.- Clasificación de las membranas.

Membranas isotrópicas.

- **Membranas Microporosas.** Tienen una estructura rígida, con poros uniformemente distribuidos e interconectados, del orden de 0.01 a 10 μm de diámetro. Toda partícula mayor que el tamaño de poro es completamente rechazada por la membrana.
- **Membranas densas, no porosas.** Consisten en una película densa a través de la cual permean y se transportan por difusión, bajo la fuerza impulsora de la presión, concentración o diferencia de potencial.
- **Membranas eléctricamente cargadas..** La separación se consigue básicamente por la exclusión de los iones de la misma carga que los fijados en la estructura de la membrana, y en menor medida por acción del radio de poro.

Membranas anisotrópicas. Consisten en una capa extremadamente delgada sobre un soporte mucho más grueso y poroso. Las propiedades de separación y flujos de permeado de la membrana dependen exclusivamente de la capa superficial. Son de uso en casi todos los procesos comerciales.

Membranas cerámicas y metálicas . En años recientes, el interés por desarrollar membranas con materiales distintos a los poliméricos ha favorecido la aparición de membranas cerámicas (ultrafiltración) y metálicas (para mezclas de gases). Ambas aportan elevada resistencia a la corrosión.

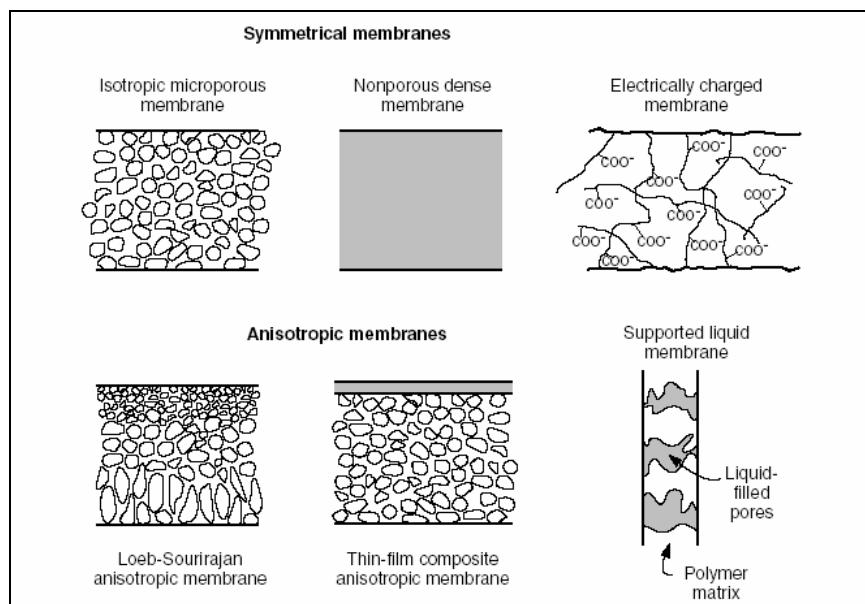


Figura 6. Estructura de los principales tipos de membranas simétricas y anisótropas.

BIBLIOGRAFÍA

Cheryan Munir. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. Technomic Publishing Co. (1998)

King, Hudson. *Procesos de Separación*. 2^a edición en español. Ed. Repla. México (1990)

R.W. Baker. *Membrane Technology and Applications*. Cap. 1 overview of science and technology. Ed John Wiley & Sons (2004)

W.S. Windson , y Kamalesh K. Sirkar. *Membrane Handbook*. Ed. Chapman & Hall(1992)

PERÍODO DE INVESTIGACIÓN

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN
EN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS PARA LA
OBTENCIÓN DE ABONOS ORGÁNICOS**

1. RESUMEN

Las plantas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos utilizando como fuente de nitrógeno el amonio y los nitratos que encuentran en el suelo o que se les aporta a través de las hojas. Este proceso de síntesis es energéticamente costoso para la planta, y puede llegar a ser crítico en condiciones de estrés hídrico o térmico, salinidad, plagas, quemaduras por herbicidas y, en general, en situaciones adversas. Está demostrado que las plantas sometidas a algún tipo de estrés necesitan incrementar el contenido total de aminoácidos libres para superar dicha situación. Esto lo hacen a costa de disminuir la formación de proteínas estructurales, es decir, a costa de su crecimiento y desarrollo. Experimentalmente se ha comprobado que la planta es capaz de asimilar aminoácidos vía radicular o foliar. Experimentos realizados suplementando aminoácidos marcados con C14 han demostrado una rápida incorporación de éstos al metabolismo vegetal, con tiempos de absorción por debajo de 24 horas. Por tanto, la producción de abonos enriquecidos en aminoácidos es un proceso de gran interés para su empleo en explotaciones agrarias.

Los aminoácidos pueden obtenerse mediante hidrólisis química de proteínas, hidrólisis enzimática, fermentación o síntesis. Desafortunadamente, la hidrólisis química origina un 50 % de D-aminoácidos que no son biológicamente activos y destruye aminoácidos esenciales como el triptófano. A través de fermentación o síntesis sólo se obtiene un aminoácido concreto y a un elevado coste. Únicamente la hidrólisis enzimática es viable para obtener L-aminoácidos libres biológicamente funcionales.

Así dentro de la línea de investigación del Grupo de “hidrólisis enzimática de proteínas” se trabaja en el diseño, optimización y escalado del proceso de hidrólisis enzimática de subproductos proteicos para la producción de abonos radiculares y foliares con aminoácidos.

Para esta investigación el objetivo propuesto ha sido el estudio y optimización de la hidrólisis enzimática de harina de sangre con una endoproteasa comercial. Se ha optado por harina de sangre PROTESAN® como sustrato proteico dado su bajo coste y su elevado contenido en proteína, en torno al 90%. Este sustrato se hidroliza adecuadamente con Alcalasa 2.4 L, en un rango de pH neutro o alcalino. Se ha estudiado la influencia del pH, temperatura, concentración de sustrato y enzima en el grado de hidrólisis y en el contenido en sólidos en suspensión que presenta el producto final. La optimización de las condiciones de operación se ha realizado por el método de las superficies respuesta. Una vez determinados los dos óptimos en las variables de respuesta seleccionadas (máximo grado de hidrólisis y mínimo contenido en sólidos en suspensión), se ha planteado un problema de optimización multiobjetivo, que ha permitido determinar el conjunto de soluciones que satisfacen adecuadamente ambos objetivos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ABONOS ORGÁNICOS.

Se define abono o fertilizante como cualquier sustancia orgánica o inorgánica, natural o sintética que aporte a las plantas uno o varios de los elementos nutritivos indispensables para su desarrollo vegetativo normal.

Los elementos nutritivos se clasifican según la cantidad requerida por la planta y la frecuencia con que en la práctica es necesaria su aportación al cultivo. Según este criterio podemos distinguir los siguientes grupos:

Macroelementos: Nitrógeno , Fósforo, Potasio, Azufre, Calcio, Magnesio. Son los absorbidos por la planta en mayores cantidades. Según la frecuencia de aplicación de este grupo de nutrientes a los cultivos podemos distinguir entre:

- *Macroelementos primarios*: nitrógeno, fósforo y potasio. Son la base de la composición de la mayoría de los fertilizantes inorgánicos (abonos NPK) y también orgánicos.
- *Macroelementos secundarios*: Azufre, Calcio y Magnesio.

Microelementos: Hierro, Cobre, Zinc, Manganese, Molibdeno y Boro. Son elementos que se absorben en cantidades mínimas.

Una primera clasificación de los fertilizantes sería el dividirlos en abonos minerales y abonos orgánicos.

Fertilizante mineral. Todo producto desprovisto de materia orgánica que contenga, en forma útil para las plantas, uno o más elementos nutritivos de los reconocidos como esenciales al crecimiento y desarrollo vegetal. Éstos a su vez se dividen en dos grupos principales:

- *Fertilizante mineral simple*: producto con un contenido declarable en uno solo de los macroelementos nitrógeno, fósforo o potasio.
- *Fertilizante mineral complejo*: producto con contenidos declarables en más de uno de los tres macroelementos anteriores.

Fertilizante orgánico. Abonos procedentes de residuos animales o vegetales, que contengan los porcentajes mínimos de materia orgánica y nutrientes, que para ellos se determinen bajo la normativa del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Unido al aporte de macroelementos y aminoácidos, los abonos orgánicos ejercen un efecto sobre el suelo que aumenta su fertilidad. Básicamente, actúan en el suelo sobre tres tipos de propiedades:

Propiedades físicas.

- El abono orgánico por su color oscuro, absorbe más las radiaciones solares, con lo que el suelo adquiere más temperatura y se pueden absorber con mayor facilidad los nutrientes.
- El abono orgánico mejora la estructura y textura del suelo, haciendo más ligeros a los suelos arcillosos y más compactos a los arenosos.
- Mejoran la permeabilidad del suelo, ya que influyen en el drenaje y aireación de éste.
- Disminuyen la erosión del suelo, tanto de agua como de viento.
- Aumentan la retención de agua en el suelo, por lo que se absorbe más el agua cuando llueve o se riega, y retienen durante más tiempo el agua durante épocas de estiaje.

Propiedades químicas.

- Los abonos orgánicos aumentan el poder tampon del suelo, y en consecuencia reducen las oscilaciones de pH de éste.
- Aumentan también la capacidad de intercambio catiónico del suelo, con lo que aumentamos la fertilidad mejorando el transporte salino.

Propiedades biológicas.

- Los abonos orgánicos favorecen la aireación y oxigenación del suelo, por lo que hay mayor actividad radicular y mayor actividad de los microorganismos aerobios.
- Los abonos orgánicos constituyen una fuente de energía para los microorganismos, fundamentales en la formación de la capa de humus del suelo

En la preparación de abonos en la agricultura actual no sólo se utiliza estiércol, sino que son muy numerosas las materias orgánicas que, solas o en mezcla con otras sustancias orgánicas o con NPK, se utilizan.

Entre las materias orgánicas empleadas se cuentan: paja y otros restos de cultivo, estiércoles de origen diverso, turbas, leonardita, compost, extractos de algas, ácidos húmicos, ácidos fulvicos, proteínas hidrolizadas, aminoácidos de síntesis, diversos compuestos orgánicos (adenina, vitaminas, ácidos polihidroxilados, etc.), así como mezclas de muy diversos extractos.

El uso de subproductos orgánicos como fuente para la obtención de fertilizantes orgánicos supone revalorizar desechos con un contenido importante en proteínas, vitaminas y ácidos orgánicos, que además de suponer una fuente de Nitrógeno y otros micro y macronutrientes mejoran la nutrición de la planta en base a los compuestos con actividad biológica que aportan (vitaminas, precursores, hormonas, aminoácidos).

En esta línea, la hidrólisis de residuos proteínicos, tales como huesos, harinas de pescado y carne, harina de plumas o harina de sangre dan como resultado un producto final con mayor o menor contenido en aminoácidos libres.

2.1.1. Fertilizantes en base a aminoácidos

Las plantas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos, tanto los proteicos como los no proteicos, utilizando como fuente de nitrógeno el amonio y el nitrato que encuentran en el suelo o que se les aporta foliarmente. Algunos aminoácidos, además contienen azufre, que la planta obtiene del sulfato del suelo.

La síntesis de aminoácidos, es costosa energéticamente para las plantas. Este gasto de energía es especialmente importante en momentos en los cuales la fisiología de la planta no es óptima, como puede ser en el caso de golpes de calor o frío, enfermedades o estrés hídrico. Además, está demostrado que las plantas sometidas a algún tipo de estrés necesitan incrementar el contenido total de aminoácidos libres para soportar dicha situación. Esto lo hacen a costa de disminuir la formación de proteínas, lo que provoca una reducción en la tasa de crecimiento de estas en dichos casos.

A finales de los años 70 surgió la alternativa en agricultura de la fertilización directa de las plantas con aminoácidos libres. Este método evitaría la transformación química del nitrógeno nítrico y amónico dentro de la planta en aminoácidos y por tanto llevaría a esta a un importante ahorro energético que le ayudaría tanto a superar tanto situaciones de estrés como para fomentar su crecimiento y desarrollo.

También se sabe que los aminoácidos están íntimamente relacionados con los mecanismos de regulación del crecimiento y desarrollo vegetal. Algunas hormonas vegetales se encuentran unidas a aminoácidos o proceden de la transformación de estos, lo que indica el importante papel que puede tener la aplicación de aminoácidos libres como fertilizantes.

Las plantas pueden absorber los aminoácidos tanto por vía radicular como por vía foliar. Por vía radicular serían absorbidos igual que el nitrógeno nítrico o amónico, y la savia los repartiría por toda la planta. La vía foliar es la más utilizada ya que pueden aplicarse junto con otros tratamientos como abonos foliares, fitosanitarios, herbicidas, etc., transportándose los aminoácidos desde las hojas al resto de la planta. La aplicación foliar es más eficiente a corto plazo que la vía radicular, aunque esta última es la aconsejable para favorecer el enraizamiento tras el transplante, fundamentalmente en hortícolas.

No todos los aminoácidos tienen la misma importancia en las plantas y se requieren también en cantidades diferentes. Por ejemplo, L-Lisina, L-Triptófano y L-Metionina son necesarias en bajas concentraciones. Ácido L-Glutámico y Ácido L-aspártico por transaminación dan el resto de aminoácidos. L-Glicina, L-Proline y L-Arginina se encuentran en gran cantidad en plantas. A pesar de lo cual todos ellos son esenciales e interdependientes, de tal forma que un exceso o ausencia de uno de ellos puede bloquear la síntesis de los otros.

Es frecuente la aplicación de fertilizantes enriquecidos o preparados a partir de concentrados de aminoácidos que se comercializan bajo la denominación general o clasificación de: abonos orgánicos, orgánico-minerales, bioestimulantes o abonos especiales.

Entre los principales efectos fisiológicos que la administración de aminoácidos comporta para la planta tenemos:

- *Economía energética de la planta.* Los organismos vegetales pueden sintetizar sus propios aminoácidos, sin embargo ésto supone un gasto energético. La aplicación externa de los mismos supone una rápida asimilación bien foliar o radicular, favoreciendo la síntesis de proteínas con un resultado energético más favorable.
- *Mayor resistencia de la planta* frente a condiciones desfavorables, superación de los estados de stress tales como falta de agua, o temperaturas extremas.
- *Efecto quelante de los aminoácidos.* Los aminoácidos son buenos agentes quelantes y contribuyen a la movilización y absorción de iones metálicos, favoreciendo la permeabilidad de la membrana celular.
- *Efectos sobre la población microbiana del suelo.* Los aminoácidos favorecen la actividad microbiana y la proliferación de la flora, forman parte del proceso de formación del humus.
- *Acción sobre los estomas.* Junto con factores externos tales como la luz y la humedad, la concentración de aminoácidos, concretamente la de ácido glutámico controla la apertura de los estomas.

A la hora de caracterizar un fertilizante en base a aminoácidos, son varios los parámetros que se pueden determinar:

- *Aminoácidos libres.* Es el contenido de aminoácidos, como sustancia química y moléculas independientes e individuales que se encuentran en el fertilizante. Es por tanto el porcentaje que se asimila de forma inmediata por vía radicular o foliar, cumpliendo las funciones esperables.
- *Aminoácidos libres levógiros.* Es el contenido de aminoácidos libres biológicamente activos. En la planta solamente intervienen en sus rutas metabólicas y en su fisiología los aminoácidos de la serie L. Sin embargo dependiendo del método de producción, el fertilizante puede presentar los dos tipos de aminoácidos, químicamente idénticos y por tanto equivalentes, pero no así en su asimilación y función en la planta.
- *Aminoácidos libres levógiros químicamente activos.* Dependiendo del método de producción, sobre todo de las condiciones de temperatura, pH, y el ambiente químico, los aminoácidos pueden haber sufrido cambios estructurales que los hagan inservibles.

Así la especificación del producto puede resultar engañosa, y porcentajes altos de aminoácidos se deben a aminoácidos totales, o bien a aminoácidos biológicamente no activos o químicamente no disponibles.

2.1.2. Fuentes de obtención de fertilizantes orgánicos.

Los fertilizantes orgánicos, por el contenido en material orgánico que precisan, constituyen una vía de aprovechamiento para los subproductos derivados de las industrias cárnica, mataderos o residuos de la actividad pesquera.

Todas estas actividades generan subproductos tales como huesos, pieles, pelo, plumas, sangre, grasas o piezas carnosas no destinadas a envasado, que constituyen una fuente importante de ácidos grasos y proteínas.

Los mataderos, aparte de los residuos derivados del despiece del animal, tales como huesos o piel, generan un importante caudal de sangre, que una vez desecada constituye un concentrado de proteínas: hemoglobina, globulinas y albúminas.

La hidrólisis de estos concentrados proteicos nos da lugar a un producto rico en péptidos y aminoácidos libres, que puede constituir la base de un fertilizante orgánico dado el contenido en N orgánico que posee, así como la funcionalidad de los aminoácidos que aporta a la planta.

2.2. SUBPRODUCTOS DE ORIGEN ANIMAL.

Las industrias cárnica generan una cantidad importante de subproductos, entendiendo como tales “todos aquellos con valor económico potencial, excluyendo la carne, que se derivan del sacrificio del animal” (Booren y Weiss, 1988). Tales subproductos poseen características físicas y químicas aptas para los usos industriales y generalmente están infrautilizados o no se aprovechan.

El aprovechamiento de estos subproductos se justifica por una doble vía:

La composición de los subproductos cárnico (proteínas, grasas, hidratos de carbono y sales minerales), los convierte en materia prima apta para la obtención de otros productos de interés para la industria alimentaria, y con un mercado creciente en las industrias cosmética y farmacéutica.

El acondicionamiento de estos efluentes, previo vertido, supone un coste económico importante dado el importante caudal que supone la línea de aguas de sacrificio dentro de un matadero, así como su elevada carga orgánica.

Es muy interesante buscar estrategias que permitan el aprovechamiento y revalorización de los subproductos de origen animal. En caso contrario, se perdería un gran potencial alimentario. Asimismo, la industria cárnica tiene la responsabilidad de evitar y disminuir la contaminación derivada de estos efluentes.

Desde la óptica del consumidor, el uso de subproductos cárnicos en los alimentos está relacionada negativamente con la percepción de baja calidad. A su vez, esta aceptabilidad está relacionada con factores muy complejos como las costumbres, la cultura y la religión.

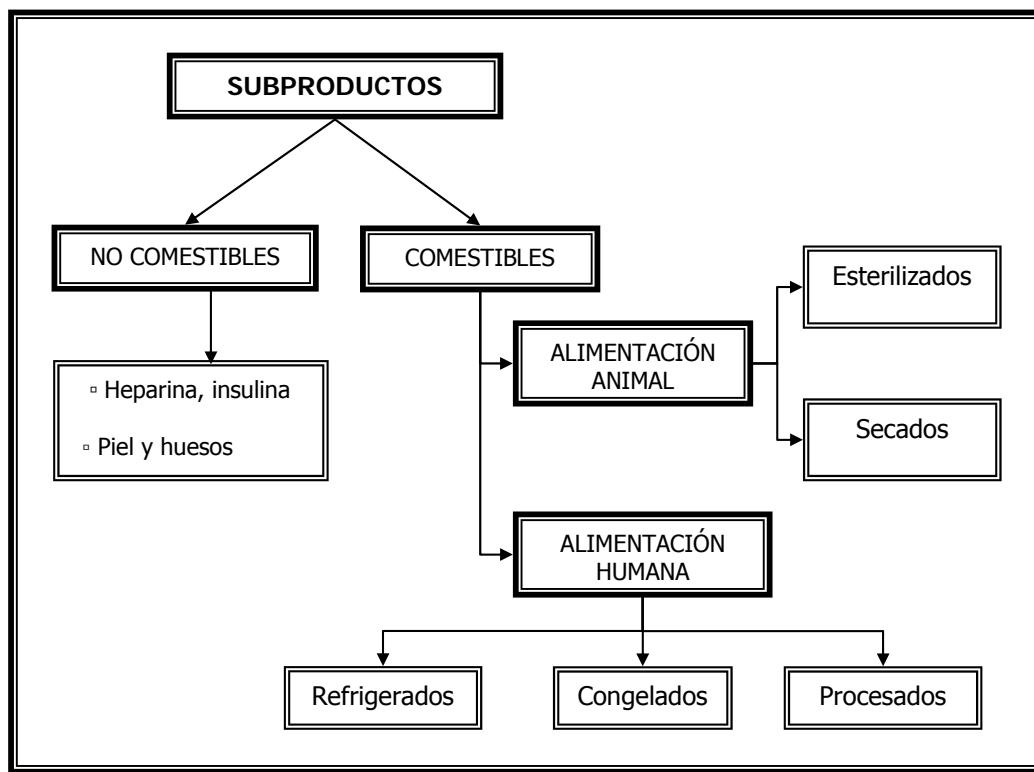


Figura 7. Principales aprovechamientos de los subproductos de origen animal.

En la Tabla 3 se muestran los usos principales y posibles aplicaciones de los subproductos de origen animal.

El aprovechamiento de estos subproductos dependerá en gran medida de los siguientes factores (Ockerman y Hansen, 1994).

- Existencia de un *proceso tecnológico* de procesado de estos subproductos, así como de conservación que permita el almacenamiento y transporte del producto final.
- Obtención de *subproductos en la cantidad suficiente* en un lugar determinado, de modo que el procesamiento de los mismos sea ventajoso económicamente.
- Existencia de un mercado potencial o real para el producto final obtenido

Tabla 3. Aplicaciones de subproductos de origen animal.

Menús para consumo humano

Grasas comestibles para la fabricación de margarinas, y productos de pastelería.

Huesos provenientes del deshuesado mecánico para fabricar sopas, harinas de huesos, diversas variedades de cerámicas o uso en el refinado del azúcar.

Sangre para consumo humano o para fabricar harinas de sangre, adhesivos o fertilizantes.

Renina para la fabricación de quesos

Instestinos para tripas de envase, cuerdas de instrumentos musicales, material de sutura quirúrgico.

Gelatina para productos de pastelería y repostería.

Substancias terapéuticas: hormonas, albúmina, bilirrubina, epinefrina, insulina, extractos hepáticos, pepsina, testosterona, tromboplastina, timocrescina y tiroxina

Piensos compuestos (generalmente muy ricos en proteínas y substancias minerales) para ganadería , animales domésticos y acuicultura.

Pelos y cuero. Piel para equipamientos deportivos, plumas para cojines, artículos deportivos y piensos para animales.

Lana y extractos de lanonina.

Grasas no comestibles de múltiples usos industriales (fabricación de neumáticos, lubricantes, insecticidas y germicidas).

2.2.1. La sangre de cerdo.

La sangre es el medio interno del organismo encargado del transporte de oxígeno y nutrientes hacia los diferentes tejidos y células, así como de la eliminación de metabolitos. Representa en torno a un 3,5% del peso del animal vivo.

La sangre contiene substancias de actividad biológica que pueden contribuir a la neutralización de agentes tóxicos, otras con función inmunológica, así como enzimas y hormonas.

En cuanto a su composición, está formada por una sustancia intracelular, el plasma, y por diferentes tipos de células en suspensión que forman la fracción celular (glóbulos rojos o eritrocitos). Ésta a su vez está formada principalmente por *hemoglobina* (Hb), denominando a la fracción restante *estroma* (membranas celulares).

La sangre tiene aproximadamente una densidad de 1,05 Kg/dm³. si sepáramos la misma en sus dos principales componentes (plasma y glóbulos rojos), cada uno de estos tiene a su vez la siguiente densidad:

- Densidad del plasma 1,03 Kg/dm³
- Densidad de los glóbulos rojos 1,09 Kg/dm³

Los valores arriba dados son valores medios. En el caso de la sangre de oveja la densidad es de aproximadamente 1,06 Kg/dm³ mientras que en el caso de la sangre de cerdo es de 1,04 Kg/dm³.

La diferencia de densidad no es suficiente para separar las dos fases por simple decantación. El proceso de fraccionamiento de la sangre, para separar el plasma de la fracción celular, consiste en centrifugar la sangre entera, a la cual, previamente, se le ha adicionado algún agente anticoagulante como ácido cítrico, citrato sódico o polifosfatos.

Tabla 4. Composición de las fracciones de la sangre de cerdo (%).

Componente	Plasma	Fracción celular
Agua	90,8	60,8
Sales minerales	0,8	1,1
Grasas	0,1	0,4
Proteínas	7,9	35,1
Albúmina	3,3	-
Fibrinógeno	0,4	-
Globulina	4,2	-
Estroma	-	5,1
Hemoglobina	-	30,0
Otras sustancias	0,4	2,6

El plasma sanguíneo, que representa aproximadamente el 60% de la sangre, está compuesto principalmente por agua (90-91%) y el resto corresponde mayoritariamente a las proteínas plasmáticas: globulinas, albúminas y fibrinógeno.

Su elevado contenido en agua comporta problemas de manipulación y conservación. La deshidratación del plasma supone un gasto energético considerable. Con respecto al plasma líquido, su elevado contenido en agua, con extracto seco básicamente proteico, supone un sustrato muy adecuado para la población microbiana, hecho que lo convierte en un producto perecedero. La refrigeración, como único sistema de conservación, no es suficiente para garantizar la estabilidad del plasma porque buena parte de la carga microbiana del plasma está constituida por microorganismos psicrotróficos, capaces de crecer a bajas temperaturas.

Con respecto a la fracción celular, ésta representa un 40% de la sangre del animal, y presenta un contenido en humedad del 60%, estando el extracto seco formado principalmente por hemoglobina (90-91% del extracto seco total) y el resto estroma, formado por los restos celulares (membranas fundamentalmente) de los glóbulos rojos.

La fracción celular presenta un mejor aprovechamiento, dado que su contenido en humedad es menor, de modo que su deshidratación acarrea menor coste

energético, así como por su contenido en hierro hémico y proteínas derivadas de la hemoglobina y el estroma. Una vez deshidratada, la fracción celular supone una importante fuente de proteínas , con un contenido proteico en torno al 90% del extracto seco.

Tabla 5. Composición química de la fracción celular de la sangre de cerdo.

Agua	62,56
Sólidos totales	37,44
Hemoglobina	32,68
Otras proteínas	1,92
Azúcares	-
Colesterol	0,049
Lecitina	0,346
Ácidos grasos	0,006
Potasio	0,496
Óxido Férrico	0,159
Magnesio	0,015
Cloro	0,147
Fósforo en ácidos nucleicos	0,041
Fósforo inorgánico	0,165
Fósforo total	0,206

2.2.2. Propiedades funcionales de la sangre.

La mayor parte de las propiedades funcionales tienen influencia sobre las características organolépticas del alimento, especialmente textura, pero también determinan el comportamiento físico de los alimentos durante el procesado, almacenamiento, y preparación del producto final.

Las propiedades funcionales de las proteínas son propiedades físico-químicas, dependientes de la estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, pudiendose clasificar en tres importantes grupos:

- Propiedades de hidratación (interacciones proteína-agua): absorción, capacidad de retención de agua, inflamamiento, dispersabilidad, solubilidad y viscosidad.
- Propiedades dependientes de la interacción proteína-proteína: precipitación y gelificación.
- Propiedades de superficie: cabe destacar la capacidad espumante y emulsionante.

En la Tabla 6 se pueden ver las principales propiedades de las proteínas sanguíneas, lo que va a determinar el aprovechamiento de las distintas fracciones.

Tabla 6. Propiedades funcionales de las proteínas de las fracciones de sangre.

Propiedad funcional	Proteínas plasmáticas	Globina
Solubilidad	Buena	Buena a pH inferior a 6
Inflamamiento con el agua	Pobre	Muy buena
Viscosidad	Baja	Mediana
Capacidad emulsionante	Mediana	Buena
Estabilidad de emulsión	Buena ⁽¹⁾	Buena a pH < 6 ⁽¹⁾
Capacidad espumante	Buena	Muy buena
Formación de geles	Muy buena a T>70°C, ⁽²⁾	No forma geles, sino una crema o pasta espesa

(1) Empeora con la presencia de sal
(2) Mejora con la presencia de sal

Estas propiedades determinan que el plasma se pueda utilizar en productos gelificados por acción del calor, tales como las salchichas. Por el contrario, la globina, que presenta una mejor capacidad de inflamamiento con el agua, se puede utilizar en sistemas fluidos y viscosos que permanezcan fluidos tras el calentamiento, o bien se pueden aprovechar sus capacidades espumante y emulsionante.

2.2.3. Valor nutricional de la sangre.

Si estudiamos el valor nutricional de la sangre (tabla 1.5.) se observa que la composición en aminoácidos de las diferentes fracciones no está bien equilibrada por lo que al contenido de aminoácidos esenciales respecta.

La sangre es rica en *lisina*, un aminoácido deficitario en la mayoría de proteínas de cereales, pero se observa una deficiencia clara en *isoleucina* y un contenido pobre en *metionina*.

El valor nutricional de la sangre no es debido únicamente a su contenido proteico sino también al hierro hémico de la hemoglobina de la fracción celular, que se absorbe a nivel intestinal entre dos y tres veces mejor que el hierro libre (Reizenstein 1980) y se considera la forma biológica mejor utilizable del hierro.

Los hidrolizados de glóbulos rojos (globina) se pueden utilizar en productos cárnicos (Caldironi y Ockerman 1982) y en el fortalecimiento de cereales por su contenido en lisina

No sólo se considera la nutrición animal, sino que el aporte de aminoácidos esenciales resulta la base en la obtención de fertilizantes orgánicos, que proporcionan nitrógeno a las plantas en forma de aminoácidos.

Tabla 7. Composición en aminoácidos esenciales de las diferentes fracciones proteicas de la sangre porcina.

Aminoácidos esenciales	Globina	Plasma	Sangre entera
Ile	0,2-0,3	1,0-3,4	0,4-0,9
Leu	13,2-13,8	9,2-10,1	12,4-13,6
Lys	9,8-10,5	6,5-9,2	9,2-9,7
Met	1,5-1,7	0,6-1,3	1,3-1,8
Phe	7,6-8,0	5,1-5,7	7,0-8,0
Thre	3,8-4,1	2,6-7,1	4,7-5,2
Trp	1,3-2,0	0,6-1,0	1,4
Val	9,4-9,6	6,8-7,4	8,0-9,1

2.2.4. Poder contaminante de la sangre

El valor aproximado del caudal de aguas residuales producidas en un matadero varía entre 200 y 600 L/cerdo (Tritt y Schuchardt, 1992). La cantidad de materia orgánica que portan estos efluentes , expresada en términos de Demanda Química de Oxígeno (DQO) se encuentra entre 1.500 y 16.000 mg/L y el contenido de Sólidos en Suspensión Totales (SST) entre 300 y 11.000 mg/L (Ruiz et al. 1993).

Los límites máximos establecidos por el Real Decreto 849/1986 para calcular el canon de vertido para instalaciones dedicadas al sacrificio de bestiar son de 500 mg/L para la DQO y 300 mg/L para los SST.

Dentro de esta aguas residuales, la sangre es el subproducto más contaminante, con una DBO₅ de 250.000 mg/L y una DQO de 375.000 mg/L (Tritt y Schuchardt, 1992)

De esto se deduce que el tratamiento de los efluentes de un matadero es imprescindible para reducir el impacto provocado por su vertido.

2.2.5. Revalorización y aprovechamiento de la sangre.

Cuando los animales se transforman en la canal en un matadero, se generan grandes cantidades de sangre. Según la FAO, en el año 2005 se han sacrificado aproximadamente unos 36 millones de cabezas de porcino en toda España.

Suponiendo que el volumen de sangre que se recoge es de unos 2,5-3 L por cerdo, se han generado unas 97.000 toneladas de sangre de cerdo durante el 2005 que, como se ha indicado en el punto anterior, es necesario aprovechar a fin de reducir la carga orgánica de los efluentes.

Antes del año 2000, la mayor parte de la sangre producida en los mataderos españoles se ha utilizado como suplemento proteico en la fabricación de piensos compuestos en forma de *harinas de sangre*, un producto barato y de gran valor nutricional para alimentación de ganado dado su elevado contenido proteico.

Desde el año 2000, dados los problemas sanitarios de encefalopatía espongiforme bovina (EEB o BSE), han aparecido nuevos reglamentos sanitarios para los piensos que contengan proteínas de origen animal (Orden APA/1556/2002 publicada en el BOE 25/06/2002) que prohíbe temporalmente el uso de proteínas animales elaboradas en el territorio de la Unión Europea.

En la actualidad, existe mayor flexibilidad en este aspecto considerándose a la sangre un producto de bajo riesgo, y aprovechable siempre que el producto final posea buenas características higiénico-sanitarias. La Tabla 8 muestra las principales aplicaciones de la sangre.

Tabla 8. Aplicaciones de la sangre.

Alimentos	Agente emulsionante, estabilizante, gelificante, clarificante, colorante, componente nutricional, substituto de la clara de huevo
Piensos Compuestos	Suplemento de lisina, estabilizador de vitaminas, sustituto de la leche, componente nutricional.
Fertilizantes	Aporte de Nitrógeno y aminoácidos, estabilizante del pH del suelo, componentes minerales.
Laboratorios	Medios de cultivo, peptonas, albúminas, globulinas, esfingomielina, catalasa.
Medicina	Pruebas bioquímicas de aglutinación, inmunoglobulinas, técnicas de fraccionamiento, factores de coagulación, material de suturas quirúrgicas, fibrinógeno, derivados de fibrina, serotonina, plasminógeno, aditivos del plasma.
Otros sectores	Adhesivos, cuero y tejidos, coadyuvantes de insecticidas, extintores para incendios, fabricación de cerámica y plásticos, formulaciones base para plásticos y cosméticos.

2.2.6. La harina de sangre

Se conoce como harina de sangre como al extracto seco resultante de deshidratar la sangre hasta obtener un producto final con un 8-10% de humedad.

La harina obtenida a partir de la sangre es muy rica en proteínas. Ello es debido a que tanto el plasma como los corpúsculos rojos tienen un elevado contenido en proteínas.

- El 80% de los sólidos contenidos en el plasma son proteínas.

- El 98% de los sólidos contenidos en los glóbulos rojos son proteínas.

Como termino medio podemos decir que de cada 1000gr de sangre 185 son de proteínas. Por ello al secar la sangre hasta dejarla con un 8-10% de humedad, resulta que el contenido en proteínas es del orden del 75-86%.

Otra de las ventajas de la harina de sangre es su alto coeficiente de digestibilidad (99%) que si lo comparamos con el de la harina de pescado (96-97%), harina de carne o huesos (87-89%) o con la harina de plumas (53-55%), veremos que es el mas alto.

La harina de sangre es muy rica en uno de los aminoácidos más importantes para el desarrollo humano y animal: la lisina. Este aminoácido suele ser un factor limitante en el crecimiento de muchos seres vivos y, su contenido en los cereales que constituyen el grueso de la alimentación del ganado es bajo. Por ello, suplementar la dieta del ganado, con un pequeño porcentaje de carne de sangre es interesante desde el punto de vista del valor nutritivo agregado.

Para resaltar mas aun el valor nutritivo de la sangre, podemos decir que se obtiene la misma cantidad de proteínas de 1kg de sangre que de 1kg de carne.

Son varios los procedimientos que se pueden seguir para la obtención de harina a partir de sangre cruda animal. Principalmente tenemos tres sistemas:

- Secado tradicional
- Coagulación – secado
- Coagulación – centrifugado – secado.

En el primero de los sistemas dados, la sangre que ha sido sometido a un tamizado grosero, va a parar a un tanque y de ahí a un secador convencional, en el que por calentamiento continuo se va evaporando el agua de constitución hasta quedar el producto con una humedad de 5-10%.El proceso citado tiene serios inconvenientes ya que:

- La evaporación supone un coste energético elevado.
- La cantidad del producto final, al haber sido sometido a un calentamiento tan intensivo, es muy deficiente.
- El secado requiere de cinco a seis horas por carga.
- La sangre es un producto difícil de secar .

El segundo de los procedimientos consiste en intercalar entre el tanque y el secador anteriormente citado un depósito intermedio para la coagulación por calor de la sangre. Una vez coagulada, se hace un prensado con lo cual se puede separar una cierta cantidad de agua. previa al secado final.

Por ultimo, tenemos el procedimiento coagulación – centrifugado – secado. En este sistema , la sangre es coagulada y separada mecánicamente en un

decantador centrífugo horizontal donde hasta el 75% del agua presente es eliminada. La sangre ya deshidratada pasa a un secado final. Dado que hemos ya eliminado $\frac{3}{4}$ partes del contenido en humedad, este secado se realiza en breve tiempo (1 a 3 horas) y el producto final es de elevada calidad.

2.3. HIDRÓLISIS DE PROTEÍNAS.

El deseo de mejorar la calidad de los productos procesados de la industria alimentaria, así como de revalorizar los subproductos y residuos derivados de ésta, han provocado un creciente interés en la obtención y estudio de las propiedades funcionales de los hidrolizados de sustratos de base proteica.

Una reacción de hidrólisis implica la ruptura de un enlace peptídico por acción del agua y catálisis enzimática, ácida o básica fuerte. La siguiente ecuación muestra una reacción de hidrólisis catalizada por una proteasa.



La hidrólisis enzimática de proteínas transcurre a través de un conjunto de etapas en serie, dando péptidos de tamaño decreciente.

Proteínas → proteosas → peptonas → péptidos → aminoácidos

Cada especie intermedia se caracteriza por un tamaño molecular medio (MW) y con la relación nitrógeno amino/nitrógeno total (AN/TN).

Tabla 9. Clasificación de las distintas fracciones de hidrolizado.

Espezie	MW	AN/TN
Proteínas	>20000	<0.01
Proteosas	5000-10000	<0.01
Peptonas	1000-6000	0.1-0.5
Péptidos	200-500	0.5-0.8
Aminoácidos	75-200	0.8-0.9

En comparación con los métodos tradicionales (hidrólisis ácida y alcalina), la hidrólisis enzimática ofrece indudables ventajas:

- *Selectividad.* No existen procesos de degradación del sustrato ya que las enzimas son selectivas para un tipo de enlace.
- *Operación a pH y Temperaturas moderadas.* A diferencia de los métodos tradicionales los pH están comprendidos entre 5-8 y las temperaturas entre 40-60°C.

- *Mantiene o mejora el valor nutritivo.* La hidrólisis alcalina destruye, en la hidrólisis de proteínas, los aminoácidos arginina y cisterna, mientras que la hidrólisis ácida hace lo mismo con el triptófano.
- *No añade sustancias extrañas al medio.* Después de una hidrólisis ácida o alcalina es necesario neutralizar y por tanto se eleva apreciablemente el contenido en sales.
- *Separación o desnaturalización de la Enzima.* La desnaturalización de la enzima se lleva a cabo mediante métodos térmicos, mientras que su separación de la mezcla de productos se realiza mediante columnas de carbón activo o módulos de ultrafiltración.

Normalmente la elección de la fuente proteínica a utilizar como sustrato de la hidrólisis se realiza en función del uso final que vaya a tener el hidrolizado y del valor añadido conseguido con respecto al sustrato de partida.

2.3.1. Sustratos proteínicos

Si el interés se centra en las propiedades nutritivas del hidrolizado, como fuente de nitrógeno y de péptidos bioactivos nos pueden interesar como materia prima las proteínas lácteas y de soja, de importante aplicación en dietas infantiles y enterales. En otras ocasiones se quieren aprovechar las propiedades gelificantes y emulsificantes del hidrolizado, eligiendo como sustrato proteínas cárnicas tales como el colágeno o gelatina.

Con respecto a las proteínas procedentes del pescado, se ha demostrado que la hidrólisis enzimática de las mismas da origen a péptidos de baja alergenicidad y propiedades antihipertensivas, antioxidantes y opiáceas. De las conchas de moluscos y otras estructuras similares es interesante la obtención de quitina.

Como último ejemplo citaremos las proteínas procedentes de la sangre, fundamentalmente hemoglobina, cuya hidrólisis da lugar a hidrolizados de alto valor añadido por su contenido en hierro hémico, fácilmente asimilable por nuestro organismo, así como péptidos procedentes del plasma con excelentes propiedades emulsificantes.

2.3.2. Proteasas comerciales.

Las proteasas pueden clasificarse según varios criterios:

El origen: animal, vegetal, bacteriano o fúngico.

Su acción catalítica, diferenciándose entre *endopeptidasas o proteinasas* si rompen al azar el interior de las cadenas peptídicas y *exopeptidasas o peptidasas* si separan aminoácidos y dipéptidos de los extremos de las cadenas peptídicas.

La naturaleza del sitio catalítico: así las endopeptidasas pueden ser serina-, metalo- o aspartato- proteinasas, y las exopeptidasas en amino-, carboxi- o dipeptidasas.

Las primeras enzimas proteolíticas utilizadas en la industria alimentaria fueron proteasas pancreáticas de origen animal, si bien cada vez están adquiriendo mayor importancia las de origen bacteriano o fúngico. Se comercializan como mezclas de enzimas en estado líquido o como pellets secos.

La siguiente tabla muestra las principales enzimas comerciales y su condiciones de estabilidad.

Tabla 10. Características de algunas proteasas industriales.

Enzima	Origen	Estabilidad	
		pH	T (°C)
Alcalasa 0.6L	<i>B. licheniformis</i>	4 < pH < 11.5	50 < T < 60
Neutrasa	<i>B. subtilis</i>	6 < pH < 8	45 < T < 55
Protease 660L	<i>B. subtilis</i>	7 < pH < 10	50 < T < 70
Fungal-Protease	<i>A. oryzae</i>	6 < pH < 9	45 < T < 55
P.E.M. 2500 S	tripsina porcina tripsina bovina quimiotripsina bovina	6 < pH < 10 6 < pH < 10	30 < T < 60 25 < T < 45
Corolase PP	Tripsina quimiotripsina	7 < pH < 9	45 < T < 55
Corolase PS	<i>A. oryzae</i>	5 < pH < 7	50 < T < 60
Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	6 < pH < 8.5	55 < T < 60
Corolase 7092	<i>A. oryzae</i>	6 < pH < 9	35 < T < 45
Corolase 7093	<i>A. oryzae</i>	7 < pH < 9	40 < T < 50
Corolase 7107	<i>A. niger</i>	2 < pH < 3	30 < T < 50
Bromelaina Takamina	vegetal (piña)	4 < pH < 9	20 < T < 65
Papa na Takamina	vegetal (papaya)	6 < pH < 8	20 < T < 75

2.3.3. Grado de hidrólisis

Una variable decisiva en el control de la hidrólisis de proteínas es el grado de hidrólisis, que se define como el cociente:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \quad (10)$$

Donde, h el número de enlaces peptídicos hidrolizados y h_{tot} es el número total de enlaces peptídicos que presenta la proteína.

Determinación del nitrógeno soluble: Las técnicas más usuales son el método Kjeldahl (A.O.A.C. 1995), la reacción de Biuret (Hung *et al.* 1984) o la

determinación espectrofotométrica en la región UV de péptidos con grupos aromáticos (Pelissier 1984).

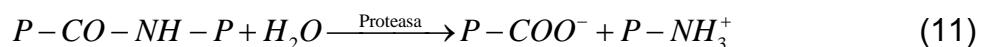
Determinación de los grupos α-amino libres. Para ello puede utilizarse valoración con formol (A.O.A.C. 1995, U.S.P. 1989), aunque se desaconseja por el elevado número de interferencias. También se usan otros reactivos químicos como el ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), ortophenilaldehído (OPA) o nihidrina que reaccionan con los grupos α-amino libres.

El método TNBS ha sido ampliamente utilizado y se basa en medidas de absorbancia a 420 nm, si bien presenta interferencias por azúcares reductores, amonio, grupos ε-amino de la lisina, así como la no reactividad de prolina e hidroxiprolina. En cuanto al OPA tiene el inconveniente de no reaccionar con prolina y sólo parcialmente con cisteína.

Osmometría. Se basa en el aumento de osmolalidad debido a la aparición de aminoácidos libres. Junto con el método del pH estato es el más utilizado puesto que no presenta interferencias por la fracción insoluble, así como la facilidad de uso y calibración del osmómetro.

Valoración del protón: método del pH-estato. Este método se basa en la valoración del protón procedente de la disociación del grupo amino a pHs básicos.

Cuando se hidroliza un enlace peptídico a pH alcalino, se forman dos unidades, una de ellas con grupo –COOH terminal y otra con grupo amino –NH₂.



Los grupos carboxilo y amino libres estarán más o menos ionizados dependiendo del pH de la reacción de hidrólisis. Los valores de pK del grupo –COOH y –NH₃⁺ en los polipéptidos se estiman en 3,1-3,6 y 7,5-7,8, respectivamente, a 25°C (Steinhardt y Beychok, 1964). Esto nos permite establecer la siguiente distribución de especies en función del pH.

Tabla 11. Estado de ionización de los aminoácidos libres.

Rango de pH	Grupo carboxilo	Grupo amino
pH<2	R-COOH	R-NH ₃ ⁺
2<pH<5	R-COOH↔ R-COO ⁻ +H ⁺	R-NH ₃ ⁺
5<pH<6	R-COO ⁻	R-NH ₃ ⁺
6<pH<9.5	R-COO ⁻	R-NH ₃ ⁺ ↔ R-NH ₂ +H ⁺
pH>9.5	R-COO ⁻	R-NH ₂

Trabajando en medio neutro-alcalino, con pH 6-9.5, superior al pK del grupo ácido, éste se encontrará completamente disociado de acuerdo a la reacción:



De modo que los protones liberados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonación de los grupos α -amino libres:



La hidrólisis enzimática en estas condiciones tiene como consecuencia inmediata una bajada acusada del pH. Para mantener el pH en las condiciones óptimas de actividad de la enzima, es necesario agregar continuamente base, de modo que los equivalentes de base añadida neutralicen los equivalentes de protones liberados. Esto nos permite conocer de modo directo el número de enlaces peptídicos hidrolizados y con ello el grado de hidrólisis de acuerdo con:

$$DH = \frac{N_b \cdot V_b}{M_p} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{h_{tot}} \quad (14)$$

Donde Nb, Vb son la normalidad y el volumen de base añadida (en mL), Mp es la masa de proteína (en gramos), α es el grado de hidrólisis del grupo amino y htot es el número de miliequivalentes de enlaces peptídicos por gramo de proteína. El grado de disociación α vendrá dado por:

$$\alpha = \frac{10^{pH - pK}}{1 + 10^{pH - pK}} \quad (15)$$

La constante pK varía en función de la temperatura, siguiendo la forma integrada de la ecuación de Gibbs-Helmholtz:

$$pK_1 - pK_2 = \frac{\Delta H^\circ}{2.303 \cdot R} \cdot \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (16)$$

siendo ΔH° la entalpía de disociación del grupo amino, con un valor medio de +45 kJ/mol (Steinhardt y Beychok, 1964).

La Tabla 12 muestra los valores h_{tot} recomendados para distintos sustratos.

Tabla 12. Valores recomendados de h_{tot} para distintos sustratos.

Proteína	h_{tot} (meq/g)
Caseína	8.2
Concentrado de suero	8.8
Carne	7.6
Hemoglobina	8.3
Gelatina	11.1
Concentrado de proteína de pescado	8.6
Proteínas de la Soja	7.8

2.4. MÉTODO DE ANÁLISIS DE SUPERFICIES DE RESPUESTA.

A la hora de obtener las condiciones óptimas de pH y temperatura que optimicen el grado de hidrólisis obtenido durante la hidrólisis enzimática, podemos utilizar como técnica de optimización el método de las *superficies de respuesta*.

2.4.1. Fundamento matemático de las superficies de respuesta.

Se conoce como Superficie de Respuesta, a una serie de procedimientos matemáticos encaminados a determinar un óptimo local o absoluto para un rango dado de las variables experimentales estudiadas.

Estudiamos un fenómeno cuantificable por una variable de respuesta medible experimentalmente Y. Dicha variable dependerá a su vez de otras variables denominadas factores, de modo que podemos establecer la relación:

$$Y = \phi(X_1, X_2, X_3, \dots, X_n, \varepsilon) \quad (17)$$

Siendo ε el error experimental asociado a la medición de la variable de salida y de los factores .

El método de Superficie de Respuesta consiste en ajustar la variable respuesta Y a un polinomio que contenga los distintos factores. Dicho polinomio podrá ser de grado $n=1$, representando la ecuación de un plano, o de grado 2 o superior en los que ajustaremos la respuesta a superficies curvas.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i X_i + \sum_{i \neq j}^N \beta_{ij} X_i X_j \quad n=1 \quad (18)$$

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^N \beta_i X_i + \sum_{i \neq j}^N \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^N \beta_{ii} X_i^2 \quad n=2 \quad (19)$$

Una vez obtenidos los valores de los parámetros $\beta_1 \dots \beta_{NN}$ por regresión múltiple podemos estimar el vector (X_1, \dots, X_N) que hace óptimo (máximo o mínimo) el valor de la respuesta Y. Se trata de resolver un sistema de ecuaciones diferenciales de acuerdo

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial Y}{\partial X_1} = 0 \\ \frac{\partial Y}{\partial X_2} = 0 \\ \dots\dots\dots \\ \frac{\partial Y}{\partial X_N} = 0 \end{array} \right\} \quad (20)$$

Existen multitud de programas aplicados a la obtención de superficies de respuesta, en general cualquier programa que incorpore un algoritmo de ajuste por regresión múltiple, Matlab, Statgraphics, MODE,...etc.

Frecuentemente la región inicial elegida no contiene al óptimo absoluto de la variable respuesta Y, de modo que necesitamos cambiar el rango inicial de los factores para trasladarnos a una región adyacente donde ensayar la nueva superficie de respuesta.

En este supuesto nos es de especial ayuda el *vector de máxima pendiente*, que nos indica la dirección en la que se produce el ascenso más pronunciado de la variable de salida. Matemáticamente, dicho vector representa el gradiente de la función respuesta.

$$\left(\frac{\partial Y}{\partial X_1}, \frac{\partial Y}{\partial X_2}, \dots, \frac{\partial Y}{\partial X_N} \right) \quad (21)$$

Estas coordenadas me permiten desplazar el centro de mi región inicial hasta un nuevo punto, de modo que vuelva a ajustar la variable respuesta a un nuevo rango de factores experimentales, y así obtener un nuevo óptimo.

2.4.2. Diseños experimentales.

Toda superficie de respuesta parte de una región inicial, con unos rangos determinados en los factores experimentales, a partir de los cuales evalúo para luego optimizar la variable de respuesta Y.

La elección del número y disposición de los factores experimentales de modo que representen fielmente la región a estudio es el objetivo fundamental del diseño experimental.

Podemos distinguir los siguientes diseños principales.

- *Diseño factorial 2^k*. Existen k factores con dos niveles a la hora de evaluarlos. Dichos niveles coinciden con el valor mínimo y máximo que

puede tomar cada factor X dentro de la región a estudio. Son fáciles de llevar a cabo por el poco número de experimentos que conllevan, pero por contraria ofrecen menor calidad en el ajuste de la superficie de respuesta.

- *Diseño factorial 3^k* . Contiene k factores experimentales con 3 niveles cada uno, correspondientes a sus valores mínimo, central y máximo. Da un elevado de puntos experimentales, por ejemplo para $k=3$ necesitaríamos $3^3=27$ experimentos. Por este motivo se prefieren diseños fraccionados 3^k-p donde p representa una fracción de puntos elegidos entre el total.
- *Diseños compuestos centrales*. Los inconvenientes planteados por los diseños factoriales se subsanan mediante la aplicación de diseños compuestos centrales (CCD), en los que se trabaja con menor número de puntos experimentales que en los 3^k , pero en cambio la densidad de los mismos dentro de la región a estudio es mejor, ofreciendo un mejor ajuste al obtener la superficie de respuesta.

Todo diseño compuesto central con k factores contendrá:

- 2^k vértices, en los que la variable X adopta los valores máximo y mínimo, al igual que el factorial 2^k . A estos puntos se les denomina vértices.
- $6k$ puntos axiales . Representan combinaciones en las que un factor toma un valor extremo (máximo o fuera del rango) mientras los demás toman valores centrales.
- n_0 réplicas del centro. Denominamos centro del diseño al punto formado por la combinación de los valores centrales ($X_{1m}, X_{2m}, \dots, X_{Nm}$)

Si tomamos $k=3$, tres factores experimentales X_1, X_2 y X_3 , los puntos del diseño se dispondrán en el espacio formando un cubo, de modo que los puntos 2^k serán los vértices, los $6k$ axiales serán puntos situados en el centro de las caras o en la perpendicular a las mismas desde el centro, y los puntos n_0 se sitúan en el centro geométrico del cubo.

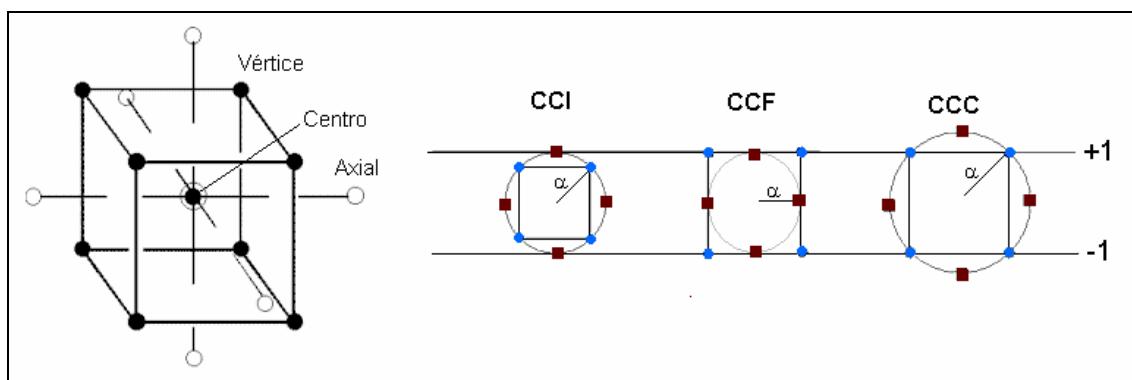


Figura 8. Distintos diseños compuestos centrales.

A la hora de realizar un diseño compuesto central buscamos que sean *rotables*, es decir, que la respuesta sea evaluada en todas las direcciones del espacio y a igual distancia respecto al centro del diseño. Este requisito conlleva que los

puntos axiales describan una esfera alrededor del cubo que contenga a los vértices. El radio α , medido respecto al centro del diseño, debe cumplir:

$$\alpha = \sqrt[4]{2^k} \quad (22)$$

De acuerdo con la disposición de los puntos axiales respecto a los vértices, distinguimos entre diseño compuesto Central Centrado en las Caras (*Faced Centred Composite, CCF*) , Circunscrito (*Central Composite Circumscribed, CCC*) o Inscrito (*Central Composite Inscribed Design, CCI*). [Fig.8]

El Diseño Centrado en las caras es un caso especial de diseño rotacional, en el que $\alpha=1$, de modo que los puntos coinciden con el centro de las caras.

2.5. FUNDAMENTOS DE LA OPTIMIZACIÓN MULTIOBJETIVO.

En la mayoría de los procesos químicos o de control, la optimización de un solo objetivo no basta para mejorar globalmente el proceso. Suelen plantearse varios objetivos que es necesario optimizar simultáneamente.

La optimización multiobjetivo se plantea cuando es necesaria la optimización de varios objetivos que planteen conflicto entre sí. En un problema de optimización multiobjetivo, el objetivo global que queremos maximizar o minimizar $F(x)$ es una combinación lineal de varias funciones respuesta $f_i(x)$ (objetivos individuales) que queremos optimizar simultáneamente.

$$\text{Minimizar/Maximizar } F(x) = [f_1(x_1, \dots, x_n), f_2(x_1, \dots, x_n), \dots, f_n(x_1, \dots, x_n)] \quad (23)$$

Las funciones respuesta $f_i(x)$ a optimizar dependen a su vez de las variables independientes o factores x_i , los cuales están sujetos a restricciones de tipo técnico de modo que los valores que estos factores pueden adoptar pertenecen a un conjunto acotado.

$$X_{i,\min} < x_i < X_{i,\max} \quad (24)$$

El espacio formado por las variables independientes $X=(x_1, \dots, x_n)^T$ se denomina *espacio de decisión*, puesto que a partir de distintas combinaciones de estos factores obtendremos distintos valores óptimos. Por otro lado, al espacio formado por las variables de salida obtenidas o soluciones $F(x)$ se le denomina *dominio de Pareto*.

Dados dos puntos, $X_1=(x_1, x_2, \dots, x_n)^T$ y $X_2=(x_1, x_2, \dots, x_n)^T$ pertenecientes al espacio de decisión, definimos las siguientes propiedades:

- X_1 domina a X_2 si los valores para todos los objetivos individuales son mejores para X_1 que los obtenidos con la combinación de factores X_2 .
- X_1 no domina a X_2 si el valor de al menos un objetivo individual alcanzado con X_1 es peor que el obtenido para el punto X_2 .

Si X_1 no domina a X_2 ni X_2 domina a X_1 , ambos puntos se llaman *no dominantes*.

El dominio de Pareto es el lugar geométrico de todas las soluciones óptimas no dominantes, donde ninguna solución es mejor que las demás si atendemos a todos y cada uno de los objetivos individuales. Por tanto el dominio de Pareto nos proporciona información sobre todas las posibles soluciones que optimicen globalmente el proceso.

Partimos de un sistema donde estudiamos la influencia de dos factores X_1 y X_2 sobre dos variables de salida a optimizar, $f_1(x_1, x_2)$. El espacio de decisión estará representado por la Figura 9.

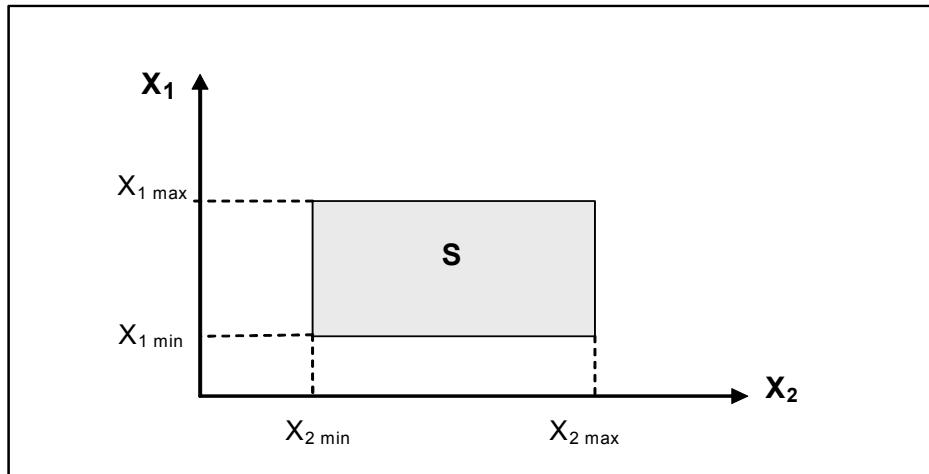


Figura 9. Espacio de decisión para dos variables independientes.

Con las distintas combinaciones de las variables independientes se obtendrán distintos valores para las variables de salida f_1 y f_2 , que forman el espacio Λ . El frente de Pareto estará formado por todos aquellos puntos del espacio Λ no dominantes entre sí, denominados *soluciones no inferiores*.

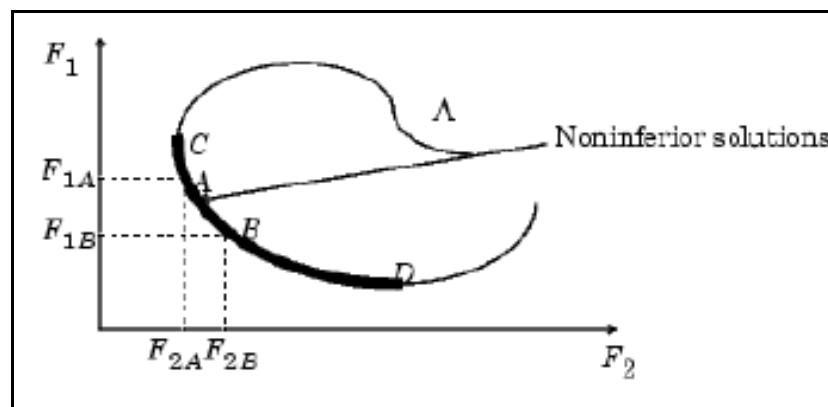


Figura 10. Espacio de respuesta y frente de Pareto.

Este conjunto de soluciones minimizan la función objetivo $F(x)$. El método utilizado clásicamente para obtener el conjunto de soluciones no inferiores es el *método de sumas ponderadas* (WSM- Weighted-Sum Method), que consiste en expresar la función objetivo $F(x)$ como combinación lineal de las variables dependientes f_1 y f_2 .

$$F(x) = \alpha \cdot \frac{f_1(x)}{sf_{1,0}(x)} + (1-\alpha) \cdot \frac{f_2(x)}{sf_{2,0}(x)} \quad (25)$$

con $\alpha \in [0,1]$

Donde $sf_{1,0}$ y $sf_{2,0}$ son los factores de normalización para f_1 y f_2 respectivamente, y α es el factor de peso, que expresa la importancia relativa entre f_1 y f_2 .

Si consideramos $sf_{1,0}$, $sf_{2,0}$ como la unidad, la ec.1.14. puede ser reordenada del siguiente modo:

$$f_1(x) = \frac{F(x)}{\alpha} + \frac{1-\alpha}{\alpha} \cdot f_2(x) \quad (26)$$

que corresponde a la ecuación de una recta de pendiente $m=(1-\alpha)/\alpha$.

Para cada peso α elegido, tendremos una recta L de pendiente m que corta al espacio α en el punto de tangencia $c(f_1(x), f_2(x))$. El punto c será la solución para el problema de optimización multiobjetivo planteado y el factor de peso elegido. [Fig.11]

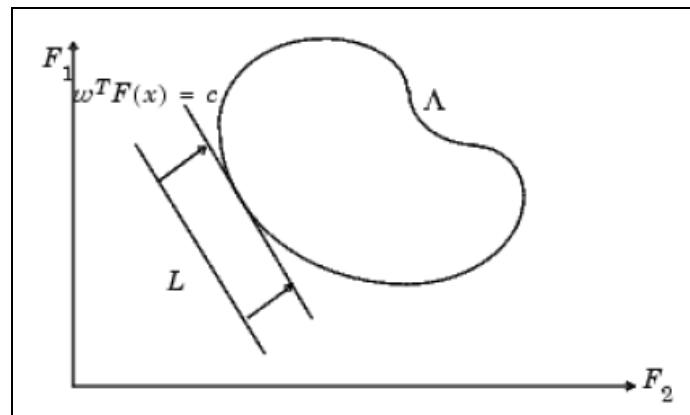


Figura 11. Método de la suma ponderada.

En ocasiones la forma del frente de pareto no es convexa, como en las figuras anteriores, de modo que el método de la suma ponderada no es el más adecuado. Para estos casos utilizamos el método de la ε -restricción.

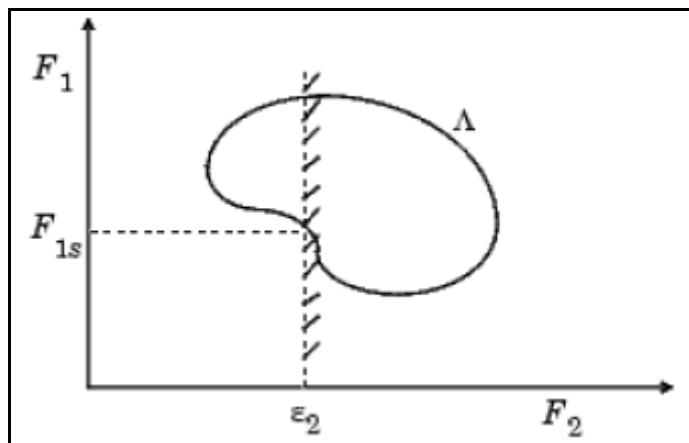


Figura 12. Método de la ε -restricción.

Este método consiste en delimitar los puntos del espacio Λ imponiendo restricciones a una de las variables dependientes f_1 o f_2 . Gráficamente estas restricciones son líneas verticales (restricciones en f_2) u horizontales (restricciones en f_1), que cortan al espacio Λ en todos los puntos, incluidas regiones de no tangencia. Una vez restringida una variable, minimizamos el valor de la otra.

En el ejemplo mostrado por la Fig 12. la obtención de los puntos del frente de pareto se limitaría minimizar F_1 sabiendo que $F_2 \leq \varepsilon$.

La elección de uno de los dos métodos de optimización descritos (suma ponderada o método de la ε -restricción) va a depender de la forma del espacio de respuesta obtenido, y en concreto de la presencia de regiones no convexas en el frente de pareto, lo que imposibilitaría la aplicación del método de sumas ponderadas al no poder definir puntos de tangencia únicos.

2.6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

El aprovechamiento de la sangre procedente de mataderos como materia prima para la obtención de péptidos no se tuvo en cuenta hasta finales de la década de los 70 (*Graham 1978, Wismen-Pedersen 1979*), cuando la mejora en los sistemas de recogida de sangre ofreció garantías higiénicas.

Dado que el aprovechamiento de la fracción plasmática se ha centrado en sus propiedades emulsionantes, la hidrólisis enzimática se ha aplicado a la fracción celular, y concretamente a la hemoglobina. El interés en esta fracción celular se ha centrado en aprovechar el contenido en hierro hémico que presenta, de fácil asimilación por nuestro organismo, así como de aislar distintos péptidos bioactivos procedentes de la hemoglobina.

Belhocine et al. (2000) estudiaron la hidrólisis de hemoglobina bovina con una enzima derivada de la papaya, en condiciones óptimas (pH 8; 55°C; e/S=33%). Se acopló esta unidad con una membrana de ultrafiltración carbosep M-15, con recirculación de permeado. Se observa que un simple modelo de Michaelis-Menten puede describir el proceso adecuadamente, sin que el tamaño de

membrana influya decisivamente en el filtrado final, dado que se genera una capa de adsorción de proteínas a lo largo de la membrana que controla el proceso.

Otros estudios cinéticos de la hidrólisis de la hemoglobina se llevaron a cabo por *Postolache y Oncescu* (1989) y *Ticu et al.* (2004). Los primeros ajustan los datos a una cinética de Michaelis-Menten con inactivación de la enzima de primer orden para la hidrólisis con alcalasa. Ticu et al. estudian la hidrólisis de hemoglobina bovina nativa o previamente desnaturalizada por la acción de la urea a pH 4.5. Como enzima utilizan pepsina inmobilizada sobre un soporte de alúmina. Constanan un aumento de la velocidad de reacción en la hemoglobina desnaturalizada con respecto a su forma nativa. El análisis del hidrolizado final pone de manifiesto la presencia de VV-hemorfina-4 y VV-hemorfina-7, ambos péptidos con actividad opioide.

Kapel et al. (2003) plantea la obtención de LVV-hemorfin-7 a partir de la hidrólisis enzimática de hemoglobina. El péptido LVV-hemorfin-7 se corresponde con los residuos 31-40 de la cadena β de la hemoglobina y posee propiedades opioides. Se propone su producción en continuo mediante hidrólisis con pepsina a pH 3, en un reactor continuo de membrana con tiempo de residencia de 2 min, equivalente a un grado de hidrólisis del 3%, determinado por TNBS. El hidrolizado es posteriormente ultrafiltrado con una membrana de celulosa con tamaño de corte de 10 kDa y presión de transmembrana de 1 bar.

Dubois y Guillochon estudiaron la hidrólisis de hemoglobina nativa o desnaturalizada con urea con pepsina a diferentes pH. Se constató que la enzima presenta distintos mecanismos en función del pH, así como con la presencia o no de urea. La presencia de urea o de pH ácido da lugar a un mecanismo zipper, en el que la hemoglobina se hidroliza parcialmente, dando péptidos de gran tamaño que se hidrolizan en etapas sucesivas hasta dar péptidos de menor tamaño y aminoácidos libres. Tras detener la reacción a distintos grados de hidrólisis se obtuvieron péptidos tales como el LVVH-7 y VVH-4 (opoides), o el α 137-141 (bactericida).

Otro aspecto importante en el estudio de los hidrolizados procedentes de hemoglobina ha sido el aprovechamiento de hierro hético de la misma, dada su mejor absorción a nivel intestinal respecto al hierro inorgánico.

Man-Jin In y Hee Jeong Chae (2002) llevaron a cabo una hidrólisis en dos etapas con alcalasa y flavorzima de 5 horas cada una. El hidrolizado resultante se ultrafiltró con membranas de tamaño de corte (MWCO) variable, observándose que los filtrados con péptidos de mayor tamaño molecular poseen una proporción hierro hémico/péptido mayor.

Vaghefi et al. (2002) llevaron a cabo un estudio *in vitro* sobre la absorción del hierro hémico. En este estudio se trató de relacionar las interacciones entre hierro hémico y péptidos con su absorción intestinal. Para ello se hidrolizó hemoglobina bovina con pepsina o subtilisilina hasta un grado de hidrólisis del 15%. La absorción *in vitro* del hierro hémico se estudió mediante células de difusión, a pH intestinal (7.5). Se observó que el aumento en el grado de hidrólisis mejora la absorción de hierro, así como el grado de polimerización en que se encuentre el grupo hemo.

Las propiedades funcionales de los hidrolizados de sangre se han estudiado no sólo en cuanto a su contenido a hierro hémico o péptidos activos. Así, *Chi-Yue* y *Kuei-Ching* (2006) estudian las propiedades antioxidantes de los hidrolizados de hemoglobina porcina. Éstos se obtuvieron mediante hidrólisis de dos etapas con alcalasa y flavorzima. A los hidrolizados se les evaluó el poder reductor y la capacidad de quelación del ión ferroso, indicativos de actividad antioxidante. En base a los resultados se dividieron los hidrolizados en tres grupos de acuerdo con su tamaño molecular, de modo que el grupo con distribución de péptidos de mayor tamaño mostró los mejores resultados.

Son escasas las referencias a optimización de la reacción de hidrólisis. El sustrato más estudiado ha sido la hemoglobina bovina, con distintas enzimas y distintas condiciones de pH y temperatura en base a la estabilidad de la proteasa utilizada.

H. Mokrane (1997), dentro de su trabajo de tesis para la Universidad de Algiers, determinó las condiciones óptimas para la hidrólisis de hemoglobina bovina con enzimas extraída de la papaya en 55°C, pH 8 y una relación enzima-sustrato del 33%, para un tiempo de reacción de 4 horas. Por su parte, *Márquez* y *Vázquez* (1999) citan como condiciones óptimas para la hidrólisis de hemoglobina bovina con Alcalasa 0.6 L un pH 7 y una temperatura de 55°C.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Harina de sangre.

La harina de sangre ha sido suministrada por APC EUROPE S.A., la única empresa española, situada en Cataluña, donde se obtiene y comercializa harina de sangre, generalmente con uso para alimentación animal.

ACP comercializa un producto, PROTESAN®, consistente en harina de sangre con una humedad inferior al 10%, y un contenido en proteína mínimo, determinado por el método Kjeldahl, del 89%, de modo que se trata de un sustrato muy adecuado para la hidrólisis.

Tabla 13. Análisis típico de la harina de sangre suministrada

Análisis típico	
Nitrógeno total	14.7%
Fosfato	0.35%
Calcio	440 ppm
Hierro	0.25%
Sodio	0.56%
Grasa bruta	1.5%
Cloruro	0.3%
Potasio	0.294%
Manganoso	30 ppm
Proteína digestible	99%
Aminas biogénicas	80%

De acuerdo a estas propiedades, el producto se podría utilizar directamente como fuente de nitrógeno, bien para alimentación animal o bien como fertilizante sólido.

Con la hidrólisis pretendemos mejorar el contenido en péptidos y aminoácidos libres del producto final. Para ello, es importante caracterizar a la harina de sangre en cuanto al contenido en aminoácidos que presente (aminograma).

Este dato nos permite conocer el número de enlaces peptídicos disponibles (h_{tot}), que nos permite calcular el grado de hidrólisis durante la reacción.

La Tabla 14. muestra el aminograma típico de la harina de sangre utilizada.

Tabla 14. Aminograma de la harina de sangre suministrada

Aminograma típico (g/100 g de proteína)	
Alanina	7.2%
Arginina	5.0%
Ácido Aspártico	10.0%
Cisteína	0.67%
Ácido Glutámico	10.0%
Glicina	5.0%
Histidina	6.2%
Isoleucina	1.2%
Leucina	11.4%
Lisina	9.1%
Metionina	0.67%
Fenilalanina	9.3%
Serina	4.6%
Treonina	4.1%
Triptófano	1.5%
Tirosina	2.7%
Valina	7.5%

3.2.2. Alcalasa.

La enzima elegida para la hidrólisis ha sido la Alcalasa 2.4 L (EC 3.4.21.62) de Novozymes con una actividad declarada de 2,4 UA/g (Unidad Anson).

Su nombre genérico es *Subtilisina Carlsberg*, es una proteasa bacteriana producida por varias cepas de *Bacillus subtilis* y otras especies del género *Bacillus*.

La alcalasa actúa como endoproteasa serina que hidroliza las proteínas con una especificidad de espectro amplio para los enlaces peptídicos. Esta enzima se utiliza en la industria alimentaria para mejorar o modificar las propiedades nutricionales y saborizantes de las proteínas.

La alcalasa puede utilizarse también como neutrasa, puesto que tiene un rango de actividad amplio para pH entre 5 y 11.5, con respecto a la temperatura, posee un intervalo óptimo de actividad entre 50 y 60°C.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. Reactor enzimático.

La reacción se lleva a cabo mediante un reactor encamisado de 250 mL de capacidad, con tapa separable provista de cinco bocas esmeriladas por las cuales se introduce el electrodo de pH, la sonda de temperatura y la bureta de sosa.

Tanto la sonda de temperatura, electrodo de pH como bureta de sosa se derivan de un titrino modelo 718 STAT Titrino, comercializado por Metrohm®. El pH y caudal de sosa se controlan desde el titrino, mientras que el control de temperatura se lleva a cabo desde un baño termostatizado Haake [Fig.13].

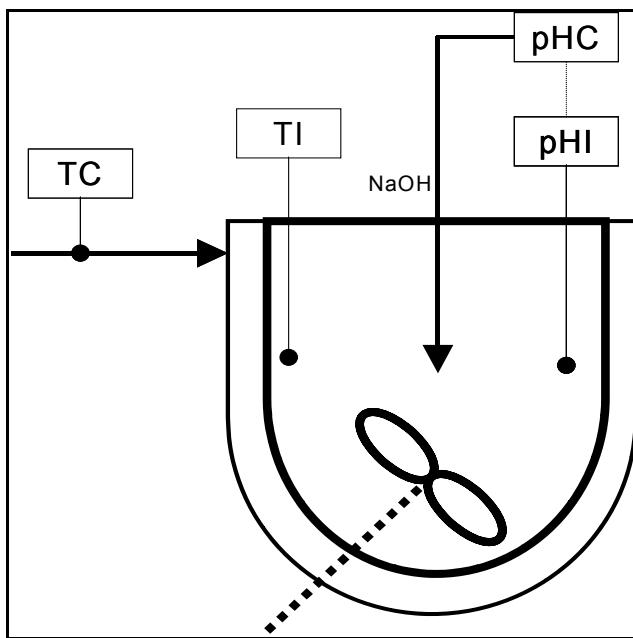


Figura 13. Dispositivo experimental utilizado para la hidrólisis

La agitación del reactor se consigue mediante un agitador magnético con tres cabezales y hasta 10 velocidades de agitación. En nuestros experimentos hemos mantenido la velocidad de agitación en torno a la posición 6.

3.2.2. Determinación del grado de hidrólisis.

Método del pH-stato.

Una variable decisiva en el control de la hidrólisis de proteínas es el grado de hidrólisis, que se define como el cociente:

$$DH = \frac{h}{h_{tot}} \quad (27)$$

De los distintos métodos existentes para determinar el grado de hidrólisis, hemos elegido el método del pH-stato porque nos permite llevar a cabo un seguimiento continuo durante la reacción de hidrólisis.

El método del pH-stato tiene algunas limitaciones en su uso, fundamentalmente el rango de pH en el que transcurre la reacción, dados los distintos equilibrios de protonación de los grupos ácido y amino.

En el rango de pH 6.5-7.5 en el que trabajamos, el grupo ácido se encuentra totalmente disociado, mientras que el grupo amino se encuentra parcialmente disociado según el equilibrio:



Podemos relacionar los protones liberados directamente con la cantidad de base consumida, de modo que podemos aplicar el método del pH-stato. Esto nos permite conocer de modo directo el número de enlaces peptídicos hidrolizados y con ello el grado de hidrólisis de acuerdo con la expresión:

$$DH = \frac{N_b \cdot V_b}{M_p} \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{h_{tot}} \quad (29)$$

Con respecto a la normalidad de la base, utilizamos NaOH 0.5 N . Preparamos la disolución a partir de lentejas de sosa sólidas, y posteriormente contrastamos con Ptalato Ácido de Potasio, de peso molecular 204,23 g/mol, calentado previamente a 105°C durante dos horas.

La valoración ha dado como resultado un valor de normalidad para la base de $N_b = 0.5028$ N, valor que utilizaremos en el cálculo del grado de hidrólisis.

El grado de disociación α depende del pH y del pK del grupo amino:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \quad (30)$$

Para el cálculo del pK, la constante de ionización del grupo amino, utilizamos la ecuación de Gibbs-Helmholtz

$$pK_1 - pK_2 = \frac{\Delta H^\circ}{2.303 \cdot R} \cdot \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \quad (31)$$

siendo ΔH° la entalpía de disociación del grupo amino, con un valor medio de +45 kJ/mol (Steinhardt y Beychok, 1964).

Como valor de pK de referencia tomamos $pK=7.8$ (25°C). A partir de la ecuación anterior, operando y tomando este valor de referencia; llegamos a la siguiente expresión, que nos permite calcular el valor del pK del grupo amino para cada temperatura (Steinhardt y Beychok, 1964)

$$pK = 7.8 + \frac{298 - T}{298T} 2400 \quad (32)$$

El cálculo de h_{tot} se estima en base al aminograma que presente la proteína o concentrado de proteínas [Tabla 15], asimilando que cada mol de aminoácidos corresponde a un equivalente de enlaces peptídicos a romper. En nuestro caso hemos estimado un valor de h_{tot} de 862 meq/ 100 g, lo que equivale a un valor medio de 8.62 meq/g

Tabla 15. Cálculo del valor de h_{tot} a partir del aminograma de la harina de sangre

Aminoácido	g/100g prot	PM (g/mol)	mmol/100g
Alanina	7.2	71.1	101.296
Arginina	5	156.2	32.013
A.Aspártico	10	115.1	86.889
Cisteína	0.67	103.1	6.496
A.Glutámico	10	129.1	77.450
Glicina	5	57.1	87.639
Histidina	6.2	137.1	45.209
Isoleucina	1.2	113.2	10.604
Leucina	11.4	113.2	100.742
Lisina	9.1	128.2	70.999
Metionina	0.67	131.2	5.107
Fenilalanina	9.3	147.2	63.189
Serina	4.6	87.1	52.826
Treonina	4.1	101.1	40.552
Triptófano	1.5	186.2	8.055
Tirosina	2.7	163.2	16.547
Valina	7.5	133.0	56.391

862.005

El pH-stat titrino

La determinación del grado de hidrólisis durante el transcurso de una reacción puede evaluarse de modo continuo mediante el método del pH-stato, valiéndonos para ello de un titrino.

Básicamente, la función del titrino se reduce al control del pH durante la reacción enzimática. El pH se ajusta al óptimo de la actividad del enzima utilizada durante la hidrólisis.

La ruptura de enlaces peptídicos conlleva la liberación de protones en función del equilibrio de disociación del grupo amino. La consecuencia directa es una bajada en el pH de la disolución. El titrino compensa dicha bajada de pH mediante adición de base, hasta que el pH vuelve a estabilizarse al valor prefijado para la reacción. Para ello el titrino deberá estar dotado de control de pH, sonda de medición de temperatura que nos permita corregir el pH en función de la misma, y un suministro de agente titrante, generalmente NaOH, si bien la titración se puede llevar a cabo en medio ácido fuerte, usando para estos propósitos HCl o ácido

cítrico. En este último caso, se adicionan protones para corregir el exceso de aniones alcalinos procedentes de la disociación del grupo $-COOH$.

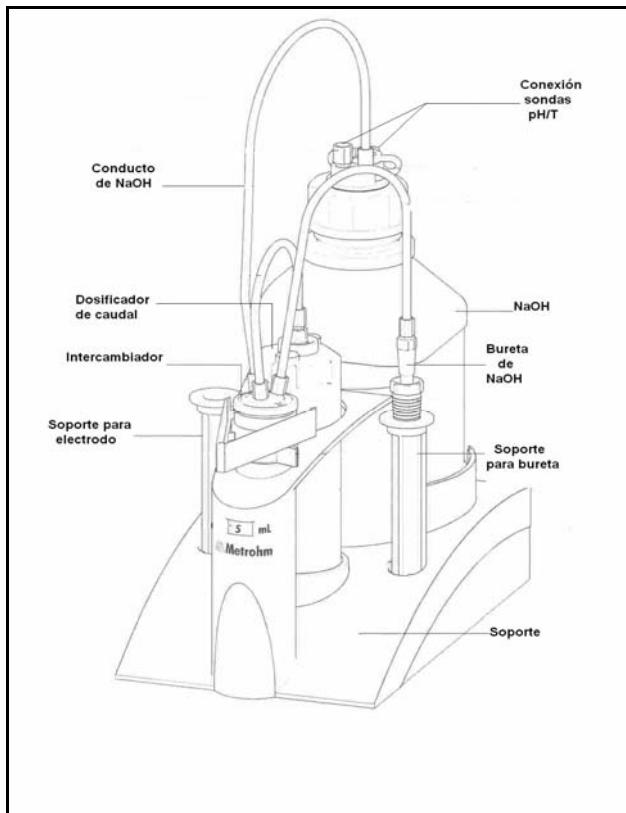


Figura 14. Dibujo del pH-stat titrino utilizado

La Figura 14 muestra el modelo de titrino utilizado en esta investigación. Se trata del modelo *pH-STAT 718*, comercializado por la compañía suiza *Metrohm*.

Consta de un depósito de NaOH con capacidad para 1,5 L, con un dosificador frontal de capacidad 200 mL, de llenado automático, de donde se bombea la sosa hacia la disolución reactante.

El control de la operación se lleva a cabo mediante un software que nos permite prefijar valores de pH y T para la reacción, así como la gama de regulación o intervalo de pH donde la velocidad de titración se hace mínima .

3.2.3. Determinación del porcentaje de sólidos en suspensión.

Para la determinación del porcentaje de sólidos en suspensión se ha seguido el siguiente procedimiento:

- (1) Se vacía el contenido del reactor y se lleva el hidrolizado a un Büchner para filtrar a vacío. Como papel filtrante hemos utilizado un filtro de celulosa Whatman grado 40, con un tamaño de poro de 8 μm .
- (2) Una vez filtrado se lleva el filtro con los sólidos retenidos a una estufa donde se calienta a 110°C durante 30 minutos para eliminar la humedad.

- (3) Transcurrimos 30 minutos se pesa el filtro y por diferencia de pesada con el peso del filtro inicial calculamos la masa de sólidos en suspensión.
- (4) Referimos la masa de sólidos obtenida respecto a la masa inicial obteniendo el porcentaje de sólidos en suspensión que presenta el hidrolizado.

3.2.4. Diseño de experimentos.

El objetivo de este trabajo es evaluar la combinación óptima de pH, temperatura y relación enzima/sustrato para la hidrólisis de harina de sangre con alcalasa.

Para optimizar estas variables hemos recurrido a un diseño factorial 3^k [Tabla 16], con tres niveles para cada factor :

pH: 6.5 – 7.0 – 7.5

T: 50°C – 55°C – 60°C

e/S: 5% - 7.5% - 10%

Una de las variables de respuesta a optimizar va a ser el grado de hidrólisis, que queremos maximizar para obtener un mayor rendimiento en aminoácidos libres en el producto final. Por otra parte, deberemos tener en cuenta también el porcentaje de sólidos en suspensión del hidrolizado final, puesto que el sustrato es altamente insoluble, de modo que otra variable de salida será porcentaje de sólidos en suspensión. En este caso el óptimo será el que minimice el porcentaje de insolubles.

De modo que el máximo de dicha variable determine un máximo de grado de hidrólisis y un mínimo de sólidos en suspensión.

Para cada combinación de factores determinaremos el grado de hidrólisis a las 3 horas y el contenido en sólidos en suspensión del hidrolizado final obtenido.

Tabla 16. Diseño 3^k para los factores pH, T y e/S

exp	FACTORES		
	pH	T	e/S
1	6.5	50	0.05
2	6.5	50	0.075
3	6.5	50	0.1
4	7.0	50	0.05
5	7.0	50	0.075
6	7.0	50	0.1
7	7.5	50	0.05
8	7.5	50	0.075
9	7.5	50	0.1
10	6.5	55	0.05
11	6.5	55	0.075
12	6.5	55	0.1
12	7.0	55	0.05
14	7.0	55	0.075
15	7.0	55	0.1
16	7.5	55	0.05
17	7.5	55	0.075
18	7.5	55	0.1
19	6.5	60	0.05
20	6.5	60	0.075
21	6.5	60	0.1
22	7.0	60	0.05
23	7.0	60	0.075
24	7.0	60	0.1
25	7.5	60	0.05
26	7.5	60	0.075
27	7.5	60	0.1

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DISEÑO DE EXPERIMENTOS.

La Tabla 17. muestra los valores experimentales medidos para las variables de respuesta. Los experimentos se han llevado a cabo de acuerdo a un diseño 3^k .

Tabla 17. Diseño experimental y valores de respuesta obtenidos

exp	pH	T	e/S	DH	SS
1	6.5	50	0.05	0.1988	0.7019
2	6.5	50	0.075	0.2289	0.6585
3	6.5	50	0.1	0.2773	0.6120
4	7	50	0.05	0.1899	0.4964
5	7	50	0.075	0.2411	0.4585
6	7	50	0.1	0.2595	0.4198
7	7.5	50	0.05	0.1580	0.4774
8	7.5	50	0.075	0.1844	0.4415
9	7.5	50	0.1	0.1919	0.3968
10	6.5	55	0.05	0.2306	0.6074
11	6.5	55	0.075	0.2677	0.5806
12	6.5	55	0.1	0.2802	0.5533
13	7	55	0.05	0.1897	0.5007
14	7	55	0.075	0.2220	0.4205
15	7	55	0.1	0.2549	0.3728
16	7.5	55	0.05	0.1772	0.3663
17	7.5	55	0.075	0.1986	0.3393
18	7.5	55	0.1	0.2335	0.3048
19	6.5	60	0.05	0.2165	0.5538
20	6.5	60	0.075	0.2394	0.5305
21	6.5	60	0.1	0.2780	0.4546
22	7	60	0.05	0.1964	0.4022
23	7	60	0.075	0.2188	0.3692
24	7	60	0.1	0.2440	0.3318
25	7.5	60	0.05	0.1222	0.4801
26	7.5	60	0.075	0.1631	0.3602
27	7.5	60	0.1	0.1694	0.3588

4.2. CURVAS DE HIDRÓLISIS.

Las figuras 15 a 23 muestran las curvas de hidrólisis obtenidas para 50°C 55°C y 60°C y distintos valores de pH y relación enzima-sustrato.

La forma general de la curva de hidrólisis presenta una pendiente inicial elevada que va disminuyendo con el transcurso de la reacción hasta alcanzar una velocidad de hidrólisis nula para tiempos lo suficientemente altos.

Esta tendencia se explicaría fundamentalmente por inactivación térmica de la enzima, más acusada a 60°C, como se aprecia en la forma más aplanada de las curvas correspondientes a esta temperatura. Postolache y Oncescu (1989) proponen para la hidrólisis enzimática de hemoglobina bovina con alcalasa una inactivación de primer orden. Esta cinética de inactivación también se ha estudiado en la hidrólisis de proteínas cárnicas y sangre entera con alcalasa (O'Meara y Munro, 1985).

En las figuras 17 y 23 se aprecia que las curvas correspondientes a $e/S=0.075$ y $e/S=0.100$ son prácticamente coincidentes. En estas condiciones de pH y temperatura la enzima se encuentra cercana a la saturación con respecto al sustrato disuelto disponible, de modo que una mayor concentración de enzima no mejora sustancialmente el rendimiento de la hidrólisis.

Otros procesos, como adsorción de la enzima sobre el sustrato insoluble o inhibición por los productos de reacción deberían ser considerados de cara a un estudio cinético de la hidrólisis de harina de sangre con alcalasa.

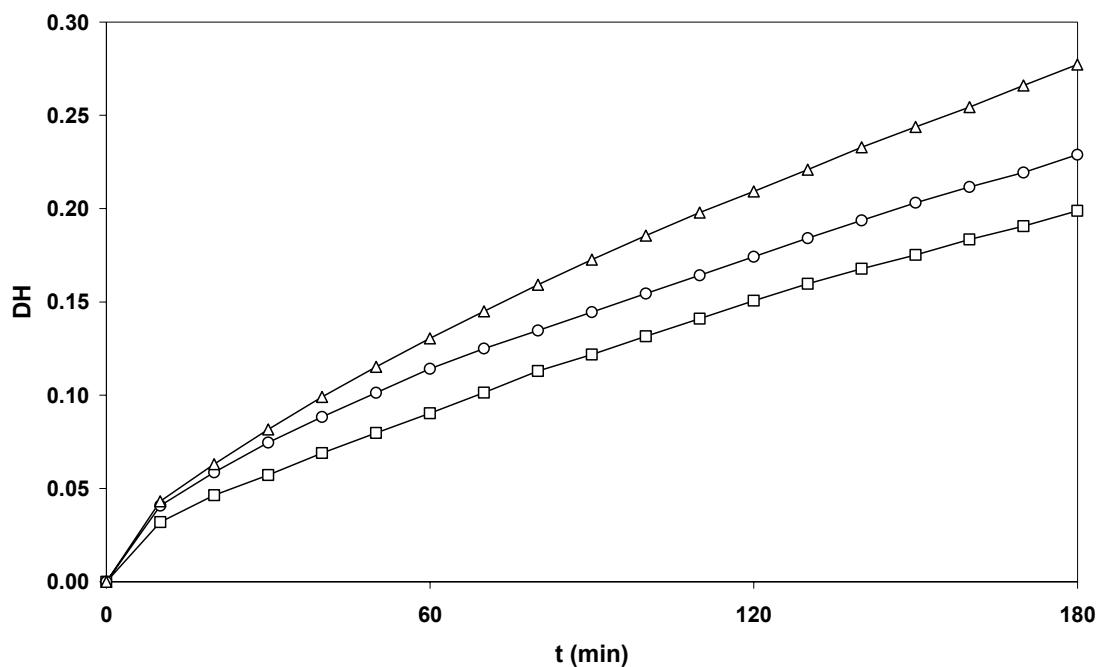


Figura 15. Curvas de hidrólisis para $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6.5$ y $e/s=0.05$ (\square), 0.075 (\circ) 0.1 (\triangle)

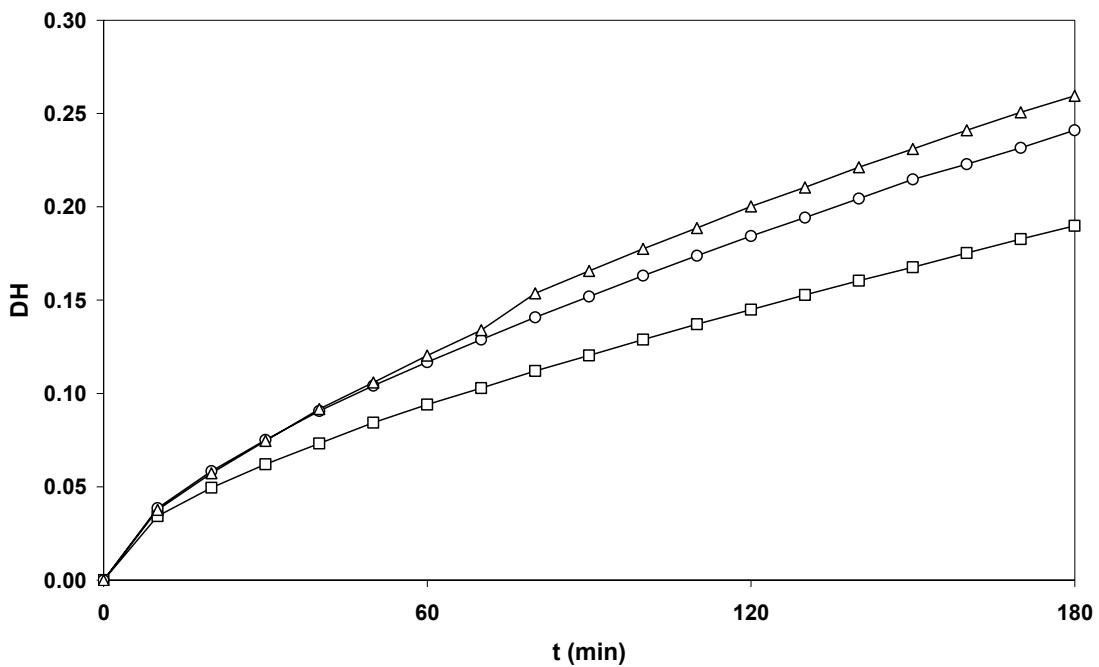


Figura 16. Curvas de hidrólisis para $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7$ y $e/s=0.05$ (\square), 0.075 (\circ) 0.1 (\triangle)

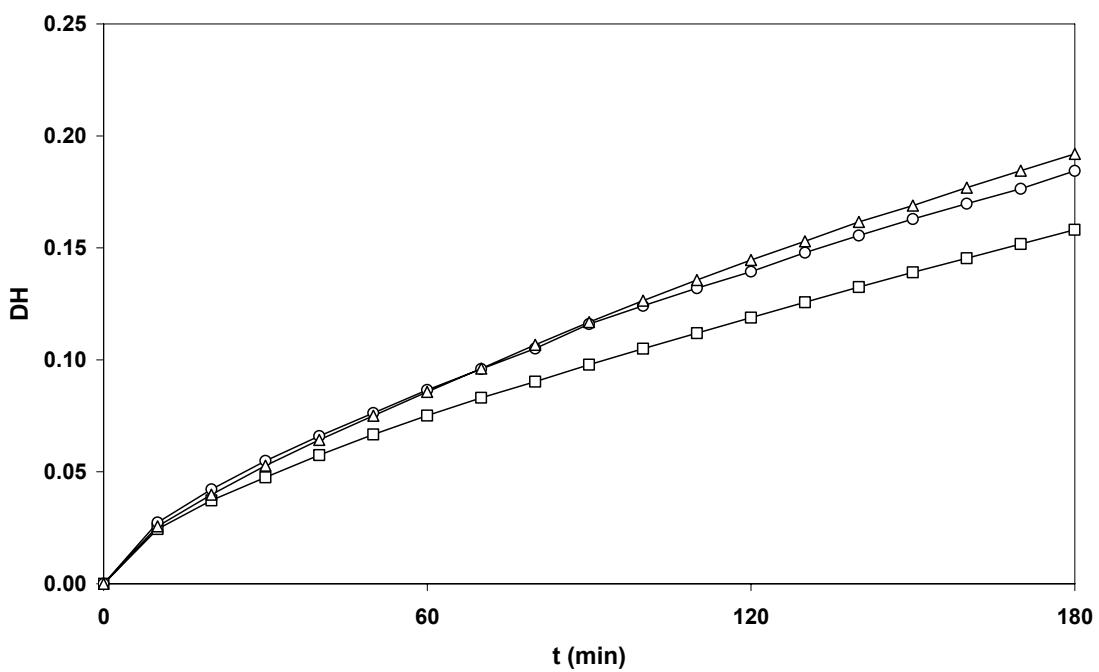


Figura 17.Curvas de hidrólisis para $T=50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.5$ y $e/s=0.05$ (\square), 0.075 (\circ) 0.1 (\triangle)

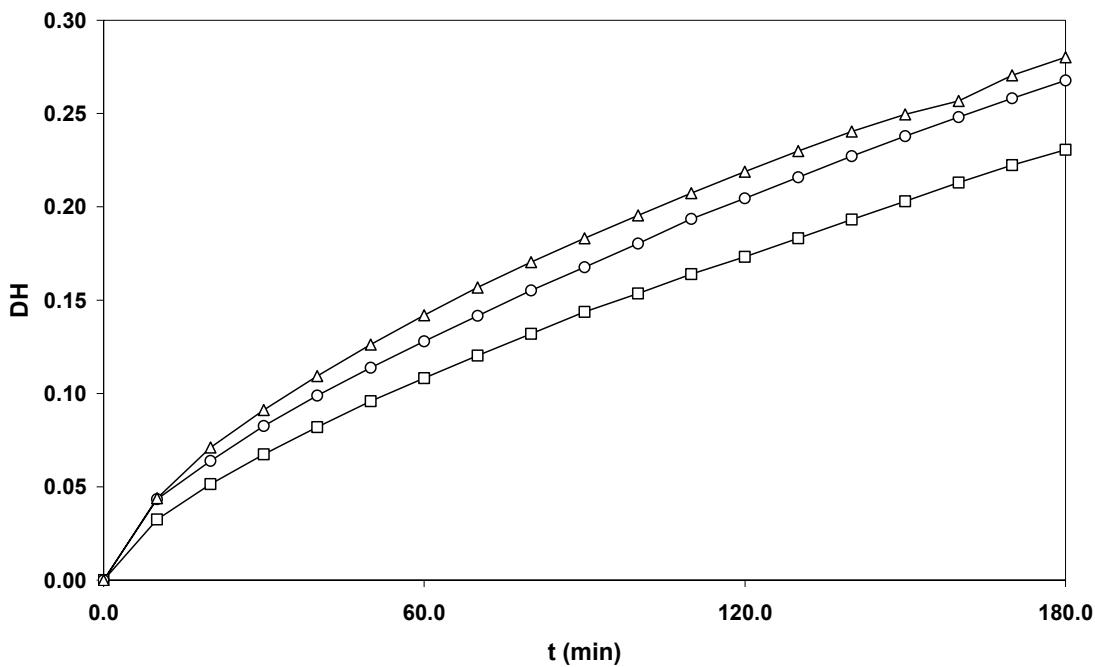


Figura 18. Curvas de hidrólisis para T=55 °C, pH=6.5 y e/s=0.05 (□), 0.075 (○) 0.1 (△)

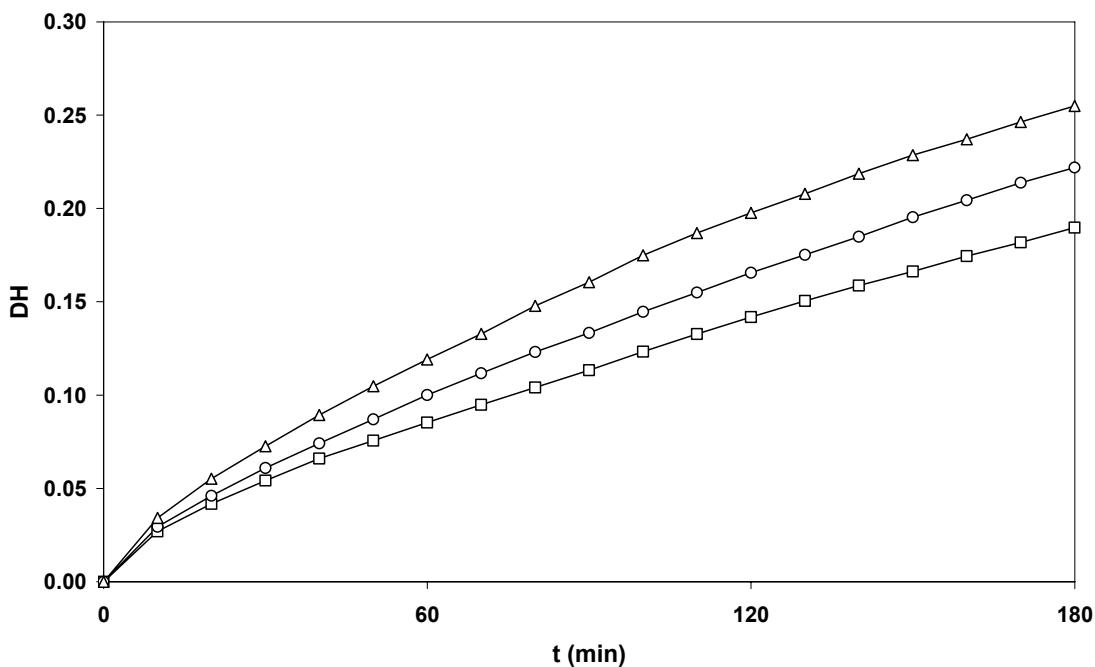


Figura 19. Curvas de hidrólisis para T=55 °C, pH=7 y e/s=0.05 (□), 0.075 (○) 0.1 (△)

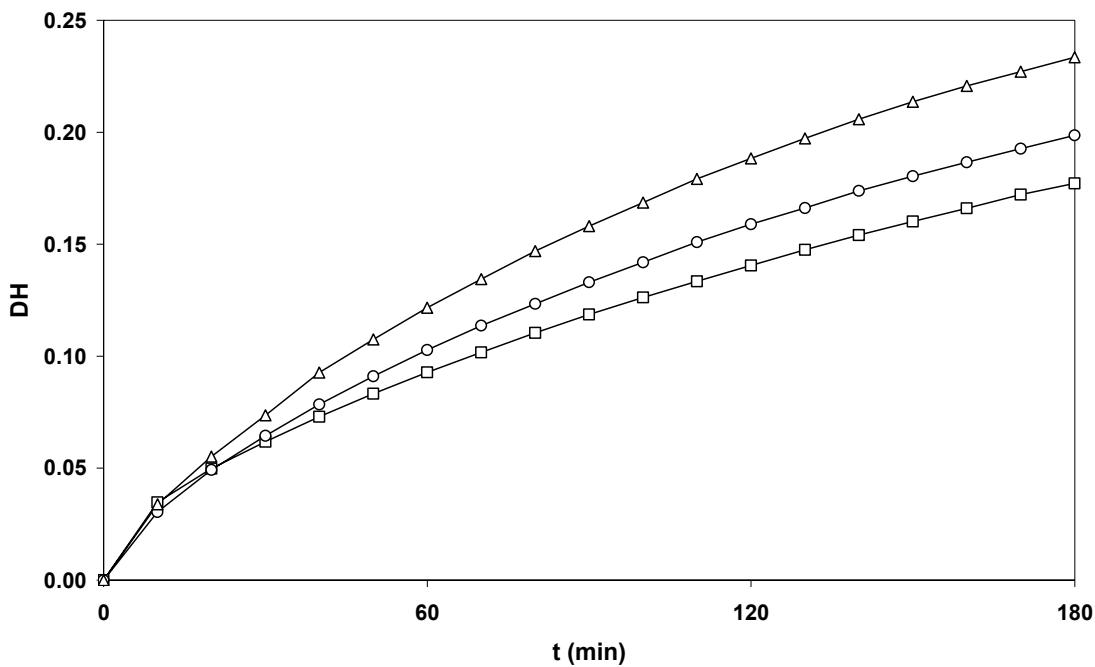


Figura 20. Curvas de hidrólisis para $T=55\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.5$ y $e/s=0.05$ (\square), 0.075 (\circ) 0.1 (\triangle)

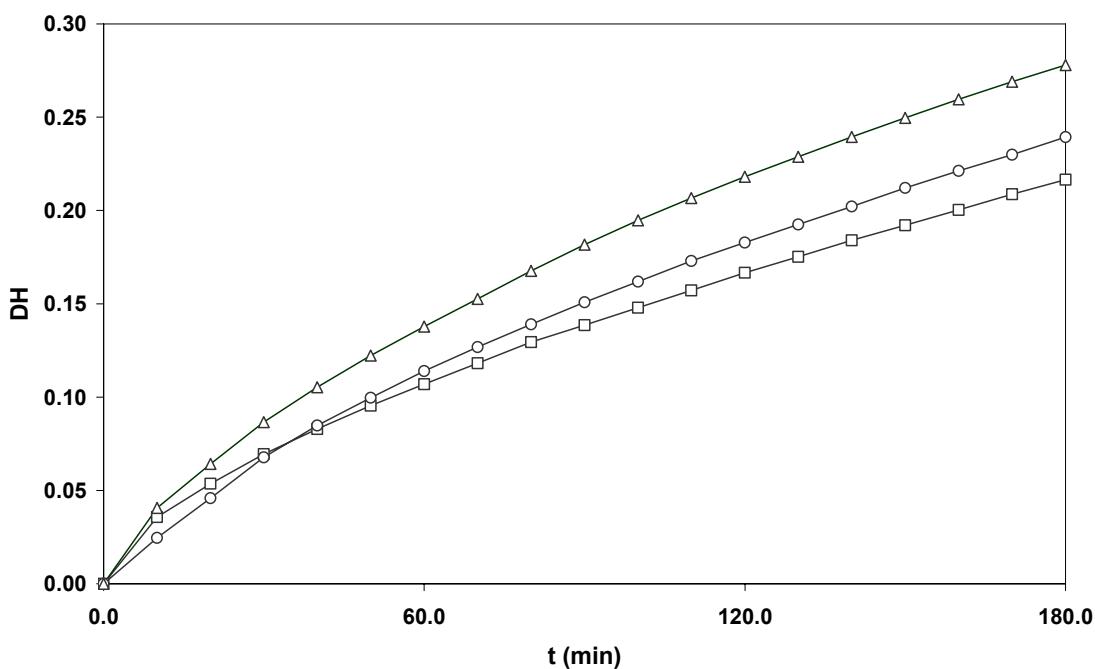


Figura 21. Curvas de hidrólisis para $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6.5$ y $e/s=0.05$ (\square), 0.075 (\circ) 0.1 (\triangle)

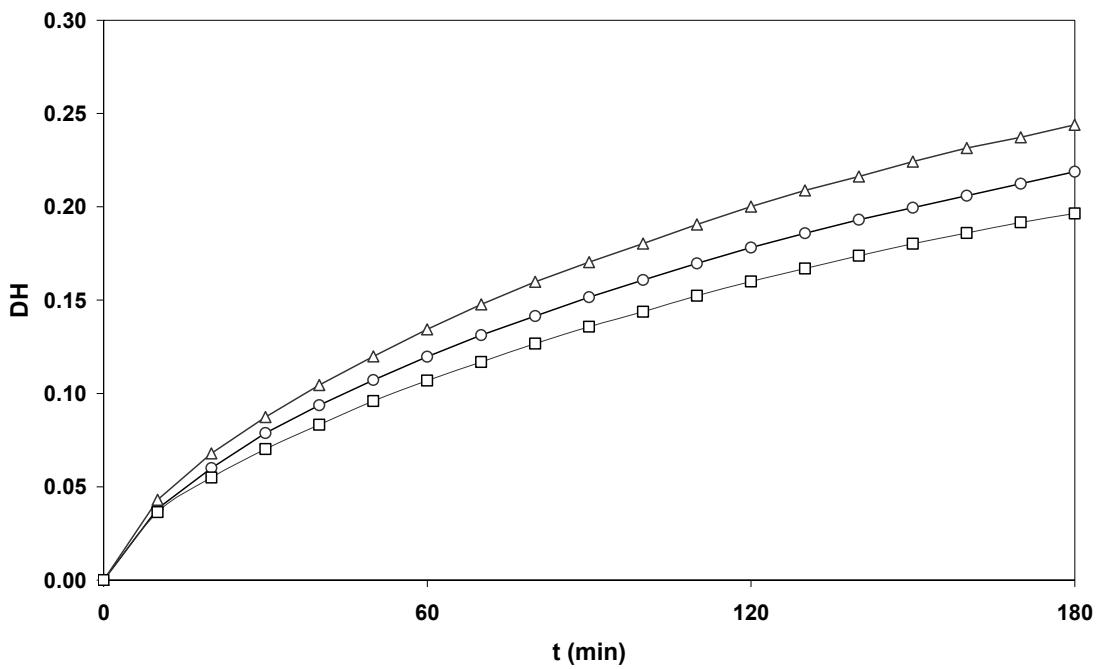


Figura 22. Curvas de hidrólisis para $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7$ y $e/s=0.05$ (\square), 0.075 (\circ) 0.1 (\triangle)

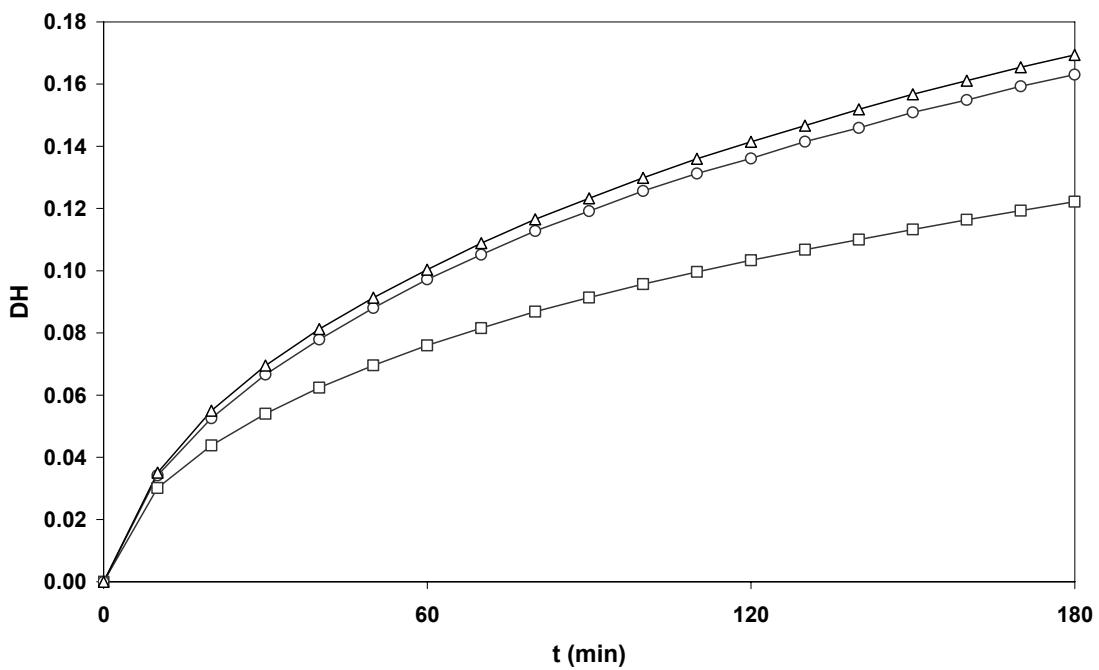


Figura 23. Curvas de hidrólisis para $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=7.5$ y $e/s=0.05$ (\square), 0.075 (\circ) 0.1 (\triangle)

4.3. SUPERFICIES DE RESPUESTA

4.3.1. Grado de hidrólisis.

Se han ajustado los datos de grado de hidrólisis final, a las 3 horas, para los distintos factores (pH, T, e/S), a un polinomio de segundo grado, con interacción entre las variables.

El análisis de varianza ANOVA nos permite decidir que factores o interacciones son más significativos en el ajuste de la variable de respuesta. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Análisis de Varianza para el grado de hidrólisis

Fuente	Suma de Cuadrados	G1	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A : pH	0.0212936	1	0.0212936	131.61	0.0000
B : T	0.000373556	1	0.000373556	2.31	0.1470
C : es	0.014416	1	0.014416	89.10	0.0000
AA	0.000871215	1	0.000871215	5.38	0.0330
AB	0.000981021	1	0.000981021	6.06	0.0248
AC	0.00022707	1	0.00022707	1.40	0.2524
BB	0.00203136	1	0.00203136	12.56	0.0025
BC	0.0000550408	1	0.0000550408	0.34	0.5674
CC	0.0000666667	1	0.0000666667	0.41	0.5295
Error Total	0.00275049	17	0.000161794		
Total (corr.)	0.043066	26			
R-cuadrado = 93.6133 por ciento					
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 90.2321 por ciento					
Error Estándar de Est. = 0.0127198					
Error absoluto de la media = 0.00843539					
Estadístico Durbin-Watson = 1.50538 (P=0.0238)					
Autocorrelación residual Lag 1 = 0.231868					

Se ha fijado un nivel de confianza $1-\alpha$ del 95%, de modo que todas las variables que tengan una probabilidad asociada *p-value* inferior a 0.05 serán significativas en el ajuste del grado de hidrólisis.

Eliminamos las variables no significativas, con $p>0.05$, de modo que podamos obtener un modelo más simplificado que relacione al grado de hidrólisis con los factores estudiados:

$$DH = -5.2976 + 0.80493 \cdot pH + 0.10536 \cdot T + 1.132 \cdot \frac{e}{S} - 0.0482 \cdot pH^2 - 0.00362 \cdot pH \cdot T - 0.00074 \cdot T^2 \quad (33)$$

Nótese que el efecto individual de la temperatura (B) no es significativo por tener $p=0.1470>0.05$, sin embargo al ser significativo el término cuadrático (BB con $p=0.0025$) debemos incluir el factor T en la ecuación. Igualmente ocurriría si alguna interacción significativa incluyese a la temperatura.

El grado de hidrólisis depende de los factores individuales (pH, T, e/S) aunque de distinto modo: mientras que con la relación enzima-sustrato la dependencia es lineal, los efectos cuadráticos para el pH y la temperatura son significativos. También es significativa la interacción pH-T, lo que nos indica que el comportamiento del grado de hidrólisis frente a la temperatura no será el mismo a distintos valores de pH, y viceversa.

Una representación del grado de hidrólisis calculado mediante la ecuación anterior, frente a los valores de respuesta observados, nos permite estimar el coeficiente de correlación, que nos da una idea de la bondad del ajuste.

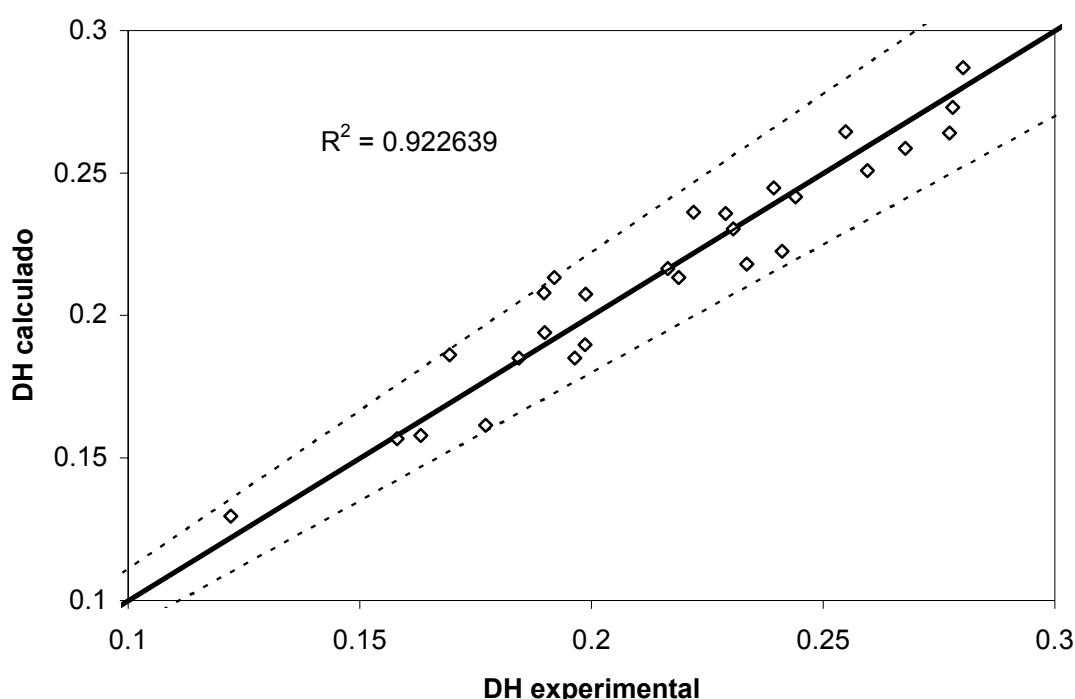


Figura 24. Representación del grado de hidrólisis calculado frente al obtenido experimentalmente

Se obtiene un coeficiente de correlación $r^2=0.9226$, de modo que el modelo obtenido predice bien el comportamiento del grado de hidrólisis ante los cambios de los factores experimentales.

Una vez tenemos una ecuación que nos liga el grado de hidrólisis con sus variables, podemos optimizar el valor de la superficie de respuesta. Nuestro objetivo es conseguir un grado de hidrólisis máximo, puesto que buscamos un hidrolizado final rico en aminoácidos libres.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 19:

Tabla 19. Combinación de factores óptima para DH

Factor	Inferior	Superior	Óptimo
pH	6.5	7.5	6.5
T($^{\circ}$ C)	50	60	55.61
e/S	0.05	0.100	0.100
DH máximo	0.2872		

Si se fija la relación enzima-sustrato en el valor óptimo e/S=0.100, podremos obtener un gráfico de contorno que represente al grado de hidrólisis frente a las variables pH y T.

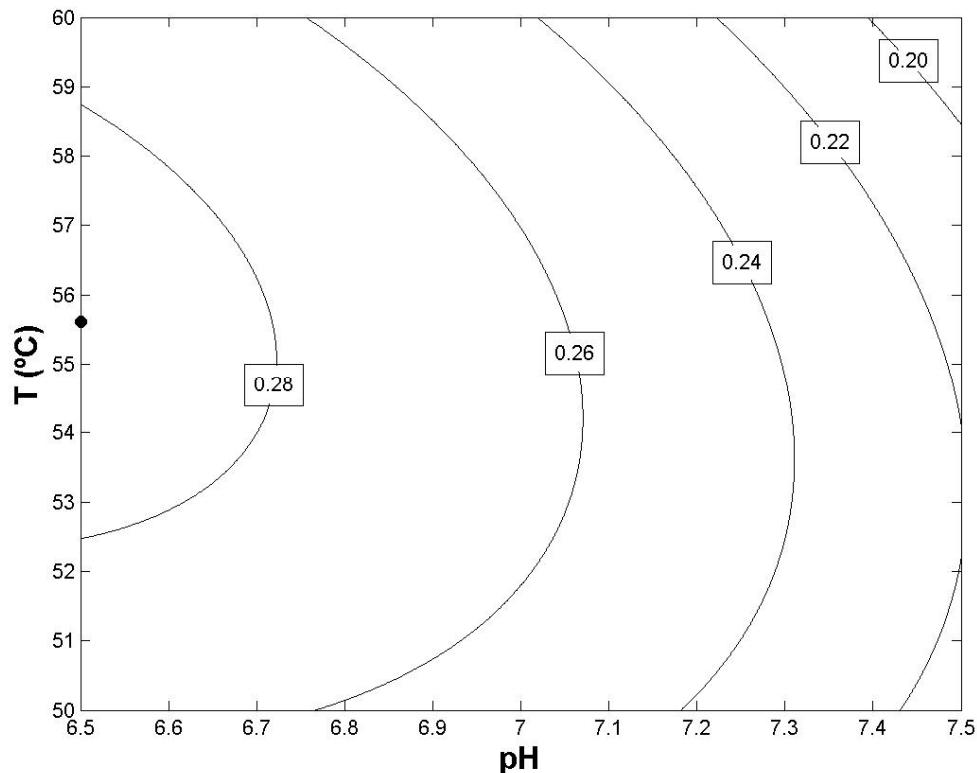


Figura 25. Gráfico de contorno del DH en función de pH y T para una relación e/S=0.1

La Figura 25. muestra cómo el grado de hidrólisis aumenta conforme baja el pH.

El máximo obtenido no es un máximo absoluto por encontrarse en un extremo de la región experimental ($\text{pH}=6.5$), de modo que podría mejorarse ensayando en una región adyacente a pH inferior. Sin embargo el titrino ofrece limitaciones

técnicas a pH inferior de 6, y como se comentará más adelante, la solubilidad de la proteína en estas condiciones es muy baja.

4.3.2. Sólidos en suspensión.

Hemos ajustado los valores de sólidos en suspensión para los distintos factores (pH, T, e/S), a una superficie de grado dos, con interacción entre las variables.

El análisis ANOVA para los sólidos en suspensión se ha ejecutado para un nivel de confianza del 95%, de modo que eliminaremos las variables con probabilidad asociada *p-value* superior 0.05 , por no considerarse significativas [Tabla 20].

Tabla.20 Análisis de Varianza para la fracción de sólidos en suspensión.

Fuente	Suma de Cuadrados	G1	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A : pH	0.165773	1	0.165773	171.64	0.0000
B : T	0.0375015	1	0.0375015	38.83	0.0000
C : es	0.0339301	1	0.0339301	35.13	0.0000
AA	0.0281992	1	0.0281992	29.20	0.0000
AB	0.0083688	1	0.0083688	8.67	0.0091
AC	0.0000340033	1	0.0000340033	0.04	0.8534
BB	0.00315257	1	0.00315257	3.26	0.0885
BC	0.00015987	1	0.00015987	0.17	0.6892
CC	0.000099498	1	0.000099498	0.10	0.7521
Error Total	0.0164188	17	0.000965814		
Total (corr.)	0.293637	26			
R-cuadrado = 94.4085 por ciento					
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91.4482 por ciento					
Error Estándar de Est. = 0.0310776					
Error absoluto de la media = 0.0202118					
Estadístico Durbin-Watson = 1.27674 (P=0.0051)					
Autocorrelación residual Lag 1 = 0.340863					

Del análisis ANOVA se deduce que el efecto del pH, temperatura y relación enzima-sustrato es muy significativo (*p*=0), así como el efecto cuadrático del pH (pH^2 con *p*= 0) . La interacción pH-temperatura es significativa, de modo que como se dijo para el grado de hidrólisis, el comportamiento de los sólidos en suspensión frente a la temperatura será distinto para cada pH.

El resto de variables presentan un valor de *p* > 0.05 de modo que las eliminamos al ser poco significativas. El contenido de sólidos en suspensión del hidrolizado final se ajustará a la siguiente ecuación:

$$SS = 19.8987 - 4.61203 \cdot \text{pH} - 0.0830722 \cdot T - 1.73667 \cdot \frac{e}{S} + 0.274222 \cdot \text{pH}^2 + 0.0105633 \cdot \text{pH} \cdot T \quad (34)$$

Podemos comprobar la bondad del ajuste mediante una representación de los valores de sólidos en suspensión calculados frente a los observados experimentalmente.

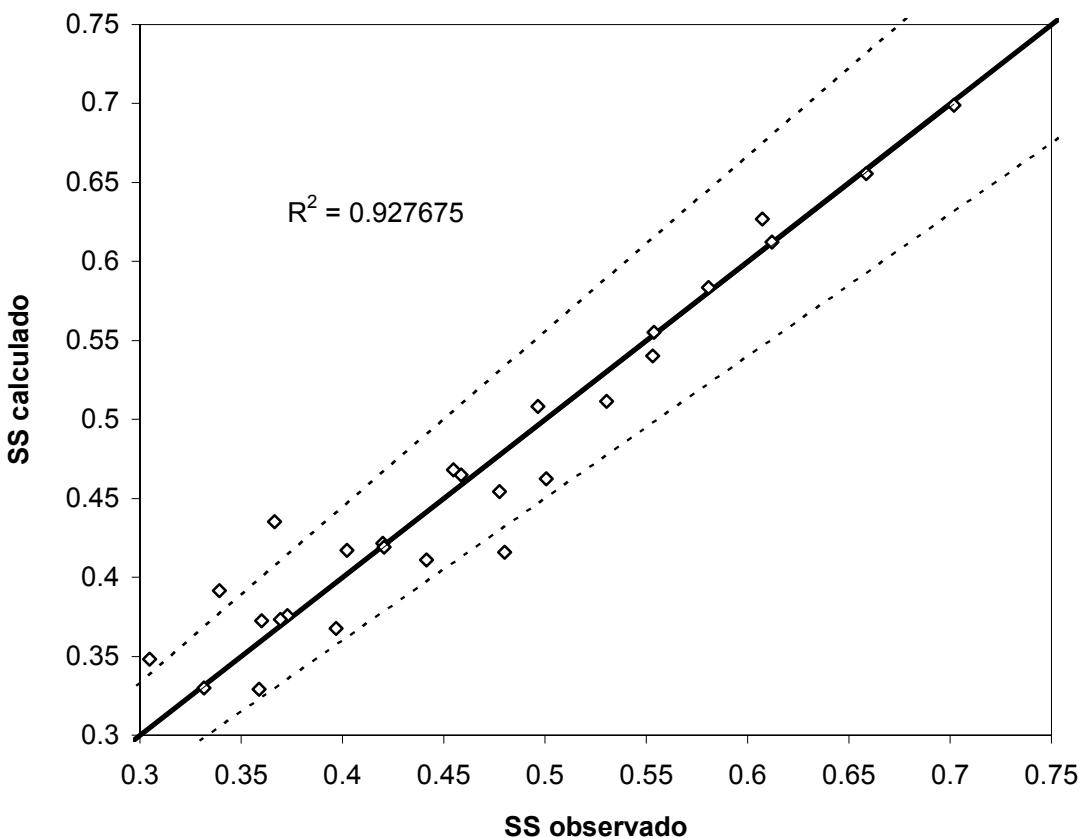


Figura 26. Representación de los sólidos en suspensión calculados frente a los obtenidos experimentalmente

Obtenemos un coeficiente de correlación $r^2=0.9276$, de modo que el modelo obtenido predice bien el comportamiento del grado de hidrólisis

Una vez obtenida la ecuación de la superficie de respuesta, pasamos a la optimización. En este caso el objetivo es minimizar el contenido en sólidos en suspensión del hidrolizado final. El mínimo obtenido se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Combinación de factores óptima para SS

Factor	Inferior	Superior	Óptimo
pH	6.5	7.5	7.2538
T(°C)	50	60	60
e/S	0.05	0.100	0.100
SS mínimo	0.3112		

Si fijamos la relación enzima-sustrato en el valor óptimo e/S=0.100, podremos obtener un gráfico de contorno que represente la fracción de sólidos en suspensión frente a los factores pH y temperatura [Fig. 27].

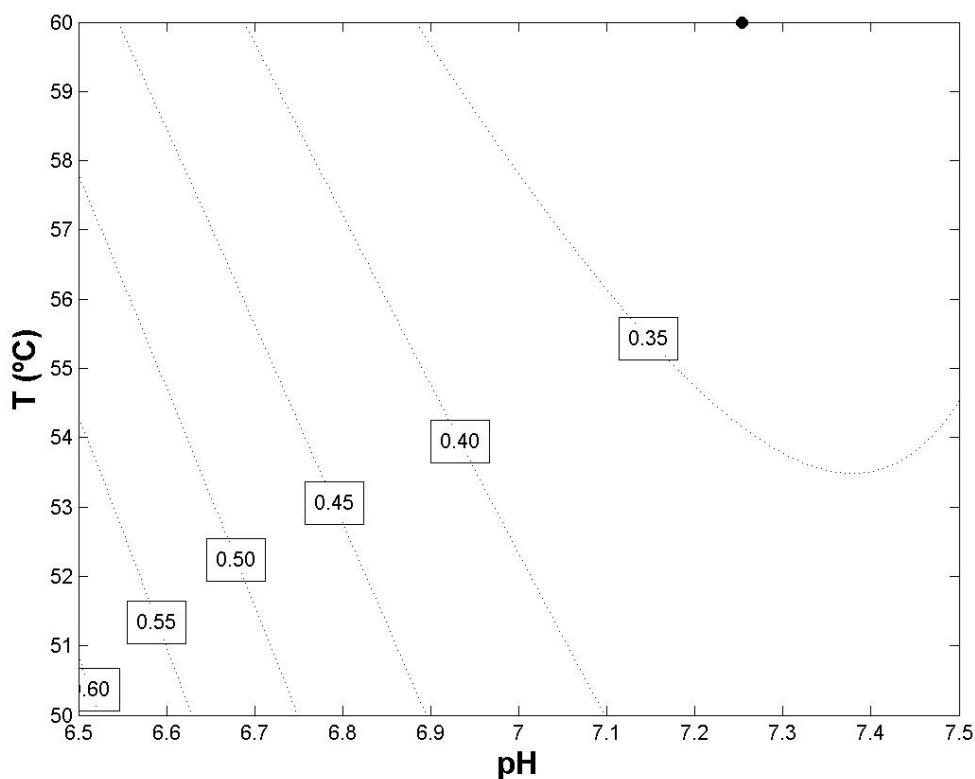


Figura 27. Gráfico de contorno de la fracción de sólidos en suspensión(SS) en función del pH y temperatura para una relación e/S=0.1

La solubilización de la proteína se ve favorecida con un aumento de la temperatura, siendo máxima para el mayor nivel de temperatura ensayado (60°C). Existe un pH óptimo, en torno a 7.2-7.3 donde el contenido en sólidos en suspensión del hidrolizado ha sido mínimo. Un aumento de la temperatura daría como resultado una mayor solubilización del sustrato, pero incidiría negativamente en el rendimiento de la hidrólisis al provocar desnaturización de la enzima.

4.3.3. Efecto de las variables de operación.

Efecto de la relación enzima-sustrato.

La relación enzima-sustrato influye de modo muy significativo ($p=0.000$) tanto en el grado de hidrólisis como en el contenido de sólidos en suspensión del hidrolizado final.

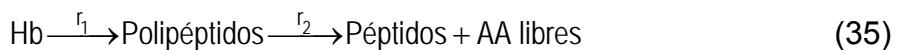
Puesto que la concentración de sustrato se mantiene fija a una concentración de 10 g/L, un aumento en la cantidad de enzima añadida conlleva mayor número de enlaces peptídicos rotos y con ello mayor velocidad de reacción. Bajo las mismas condiciones de pH y temperatura, una mayor relación enzima-sustrato conlleva mejor rendimiento de la hidrólisis, puesto que estamos trabajando con concentraciones de enzima inferiores a las de saturación del sustrato.

Durante el transcurso de la hidrólisis se liberan péptidos de menor tamaño molecular, ricos en grupos polares, que permiten la solubilización de la proteína. De este modo, en unas condiciones de pH y temperatura fijadas, un incremento en la concentración de enzima mejora el grado de hidrólisis obtenido y da como resultado un hidrolizado con menor contenido en materia insoluble.

Efecto del pH

En la hidrólisis de la hemoglobina, proteína mayoritaria de la harina de sangre, así como de otras proteínas procedentes de la fracción plasmática, se suele dar un mecanismo compuesto por dos etapas sucesivas.

En una primera etapa la enzima ataca directamente la estructura cuaternaria de la hemoglobina dando como productos polipéptidos de tamaño elevado. Esos polipéptidos son a su vez hidrolizados, dando péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos libres.



1. *Mecanismo one-by-one*. Se da cuando se hidroliza hemoglobina en estado nativo, sin desnaturalizar, en medio neutro o alcalino. La primera etapa es muy rápida, $r_1 >> r_2$: el hidrolizado final obtenido carece de hemoglobina nativa, componiéndose fundamentalmente de polipéptidos de gran tamaño, así como péptidos y aminoácidos libres en menor proporción.

2. *Mecanismo zipper*. Se da con hemoglobina previamente desnaturalizada, bien por medio ácido o por presencia de otras sustancias químicas como urea (Ticu *et al.* 2004). La etapa rápida es la segunda, $r_2 >> r_1$. El hidrolizado presenta hemoglobina nativa junto con péptidos de pequeño tamaño y aminoácidos libres.

En el rango de pH entre 7-7.5, el mecanismo predominante será el mecanismo one-by-one . En estas condiciones la hemoglobina se encuentra en estado nativo y la alcalasa actúa fundamentalmente abriendo la estructura cuaternaria de la proteína. Como consecuencia los grados de hidrólisis alcanzados no son muy altos, y el hidrolizado se compone fundamentalmente de polipéptidos.

Conforme el pH se hace más ácido, como ocurre con pH=6.5, la estructura cuaternaria de la hemoglobina es menos estable, de modo que la alcalasa se encuentra ahora con un sustrato parcialmente desnaturalizado, más accesible al ataque de la enzima. Bajo estas circunstancias la velocidad de reacción es mayor y los grados de hidrólisis final obtenidos son mejores.

Sin embargo, el efecto del pH sobre la solubilización de la hemoglobina es opuesto . La desnaturalización de la hemoglobina disminuye drásticamente su solubilidad, puesto que quedan expuestos grupos hidrófobos ocultos anteriormente dentro de la estructura cuaternaria.

Ambos procesos determinan que obtengamos mejores grados de hidrólisis a pH 6.5, aunque los hidrolizados obtenidos bajo estas condiciones presenten un elevado contenido en materia insoluble.

Efecto de la temperatura.

En el caso del grado de hidrólisis , el efecto individual de la temperatura no es significativo ($p= 0.1470$), pero sí su efecto cuadrático ($p=0.0330$) y su interacción con el pH ($p=0.0248$). La temperatura incide fundamentalmente en la cinética de desactivación de la enzima .

La Alcalasa, como el resto de las proteasas, presenta un rango de actividad máxima entre 50-60°C, decreciendo drásticamente a temperaturas mayores. El valor óptimo de temperatura para el grado de hidrólisis (55°C), se alcanza dentro de este intervalo.

Con respecto a la solubilización de la proteína, el efecto de la temperatura es sin embargo muy significativo ($p=0.000$), obteniendo un hidrolizado final más soluble a mayores temperaturas .

El análisis anterior pone de manifiesto que la optimización de una de las dos variables de salida (grado de hidrólisis o sólidos en suspensión), no es suficiente, puesto que el efecto del pH o temperatura sobre cada variable suele ser opuesto.

Es necesario por tanto aplicar una técnica de optimización multiobjetivo, que permita encontrar una solución de compromiso entre un grado de hidrólisis elevado y un contenido en materia insoluble bajo.

4.4. OPTIMIZACIÓN MULTIOBJETIVO.

Puesto que queremos maximizar el grado de hidrólisis, asegurándonos a su vez que el contenido en sólidos en suspensión sea el mínimo, debemos plantear un problema de optimización multiobjetivo.

Para ello planteamos una función objetivo que contenga las dos variables de respuesta según el método de la suma ponderada. Puesto que los objetivos de optimización individuales son opuestos (maximizar DH frente a minimizar SS), la función objetivo elegida será de la forma:

$$F_{OBJ} = \alpha \cdot DH - (1-\alpha) \cdot SS \quad (36)$$

Cuando α tiende a 0, función objetivo tiende al máximo absoluto del grado de hidrólisis (0.2872) determinado anteriormente . Por el contrario para valores lo suficientemente elevados de α la función objetivo tiende al mínimo absoluto calculado para los sólidos en suspensión (0.3112). Hemos tomado valores de α entre 0 y 1.

El espacio de decisión para las independientes (pH, T y e/S) vendrá dado por los rangos experimentales de cada una:

pH: 6.5 – 7.5

T: 50°C – 60°C

e/S: 5% - 10%

Para cada combinación ($pH, T, e/S$) del espacio S, podremos calcular el grado de hidrólisis y el contenido de sólidos en suspensión, generando el espacio de respuesta representado por la Figura 28.

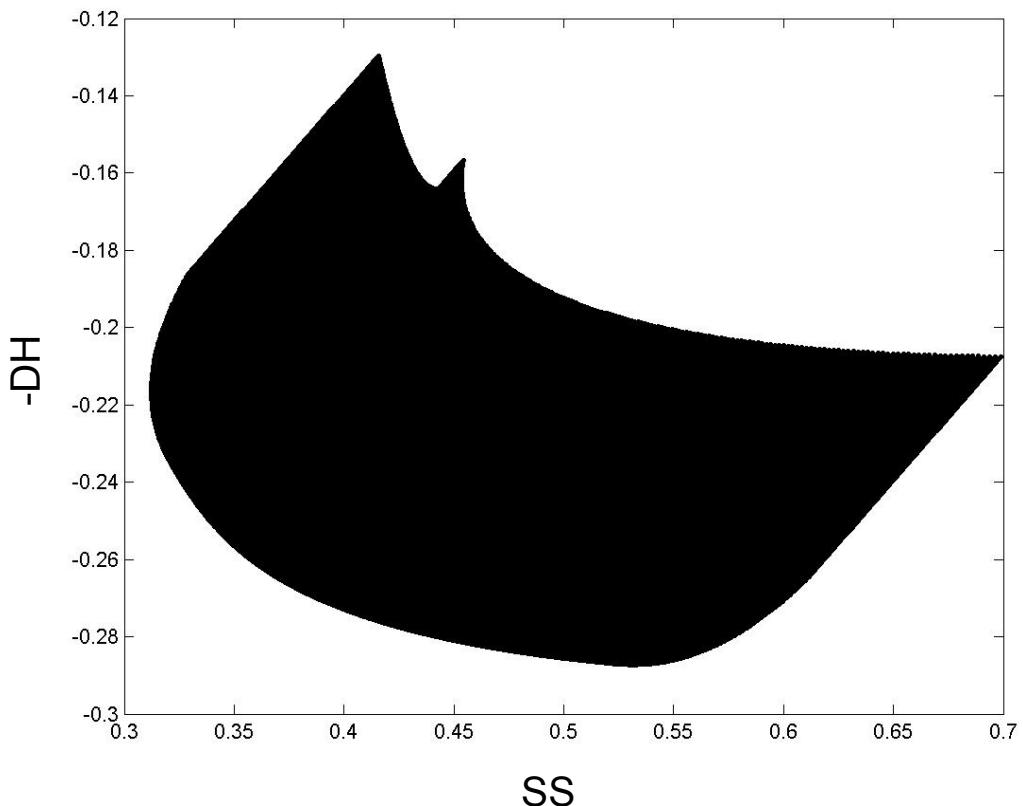


Figura 28. Espacio de respuesta generado de acuerdo a los rangos de pH y T ensayados

Hemos representado el grado de hidrólisis con signo negativo, de modo que el objetivo consista en minimizar ambas variables (minimizar $-DH$ y SS).

De acuerdo con la definición de función objetivo que hemos hecho al principio, la ecuación:

$$-DH = \frac{F_{OBJ}}{\alpha} + \frac{1-\alpha}{\alpha} \cdot SS \quad (37)$$

corresponde a una recta de pendiente $(1-\alpha)/\alpha$. Si hacemos esta recta tangente al espacio de respuesta, obtendremos los distintos puntos del frente de pareto para cada valor de α entre 0 y 1.

Estos puntos, llamados no inferiores, minimizan la función objetivo propuesta, y tienen como propiedad que no existe otro punto dentro del espacio de respuesta que mejore simultáneamente los dos objetivos individuales (minimizar $-DH$ y SS).

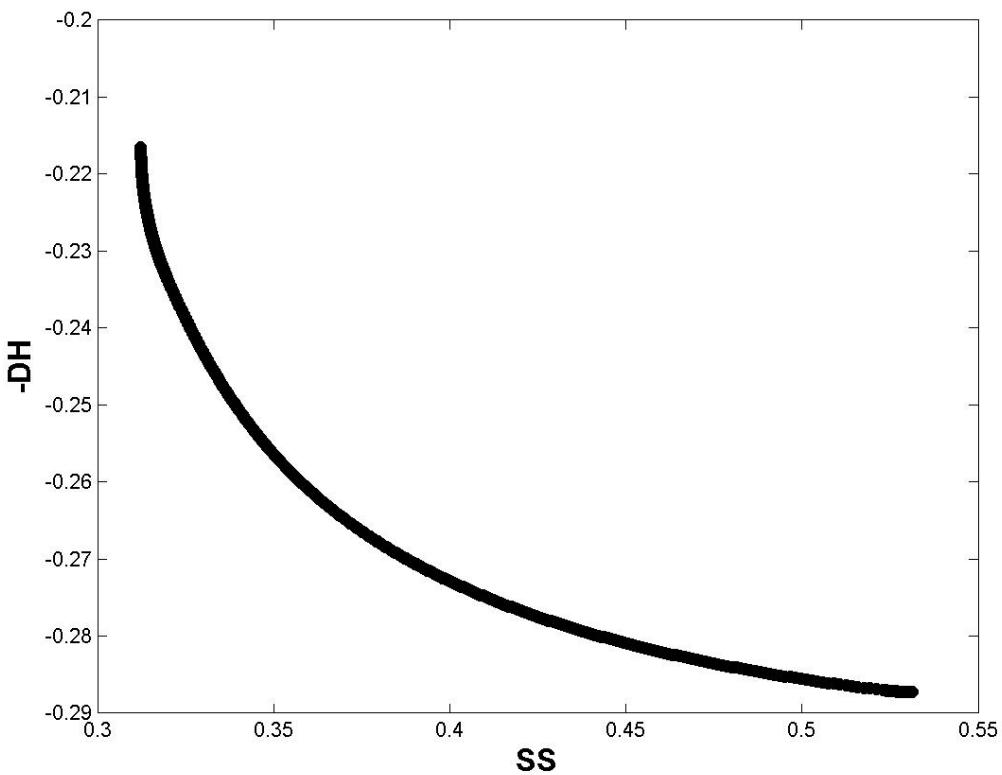


Figura 29. Frente de Pareto obtenido al minimizar la función objetivo con $\alpha \in [0,1]$

La curva mostrada en la Fig. 29. muestra el conjunto de todas las posibles soluciones que minimizan la función objetivo propuesta, es decir, que maximizan el grado de hidrólisis y minimizan el contenido de sólidos en suspensión.

La elección de la solución óptima se hará de acuerdo al peso relativo que se le quiera dar al grado de hidrólisis respecto a los sólidos en suspensión, α , cuyo valor se podrá elegir entre 0 (minimizar exclusivamente los sólidos en suspensión) y 1 (maximizar únicamente el grado de hidrólisis). Una vez elegido un valor para α , el punto de tangencia entre el frente y una recta de pendiente $(1-\alpha)/\alpha$ nos dará los valores de DH y SS correspondientes.

Puesto que las dos variables de respuesta, DH y SS son función de las variables independientes o factores pH y temperatura, podremos trasladar el frente de pareto obtenido al espacio de decisión, de modo que obtengamos las combinaciones pH-T que minimicen la función objetivo.

Una vez elegido un valor para α y determinados los valores de DH y SS que le corresponden, calculamos los valores de pH y temperatura para los que se alcanzan estos valores.

Se trata de resolver un sistema formado por las ecuaciones (33) y (34):

$$\left[\begin{array}{l} DH = -5.2976 + 0.80493 \cdot pH + 0.10536 \cdot T + 1.132 \cdot \frac{e}{S} - 0.0482 \cdot pH^2 - 0.00362 \cdot pH \cdot T - 0.00074 \cdot T^2 \\ SS = 19.8987 - 4.61203 \cdot pH - 0.0830722 \cdot T - 1.73667 \cdot \frac{e}{S} + 0.274222 \cdot pH^2 + 0.0105633 \cdot pH \cdot T \end{array} \right] \quad (38)$$

La solución de este sistema para cada valor (DH,SS) del frente de pareto conduce a la Figura 30, que muestra el conjunto de combinaciones para los valores experimentales que minimizan la función objetivo.

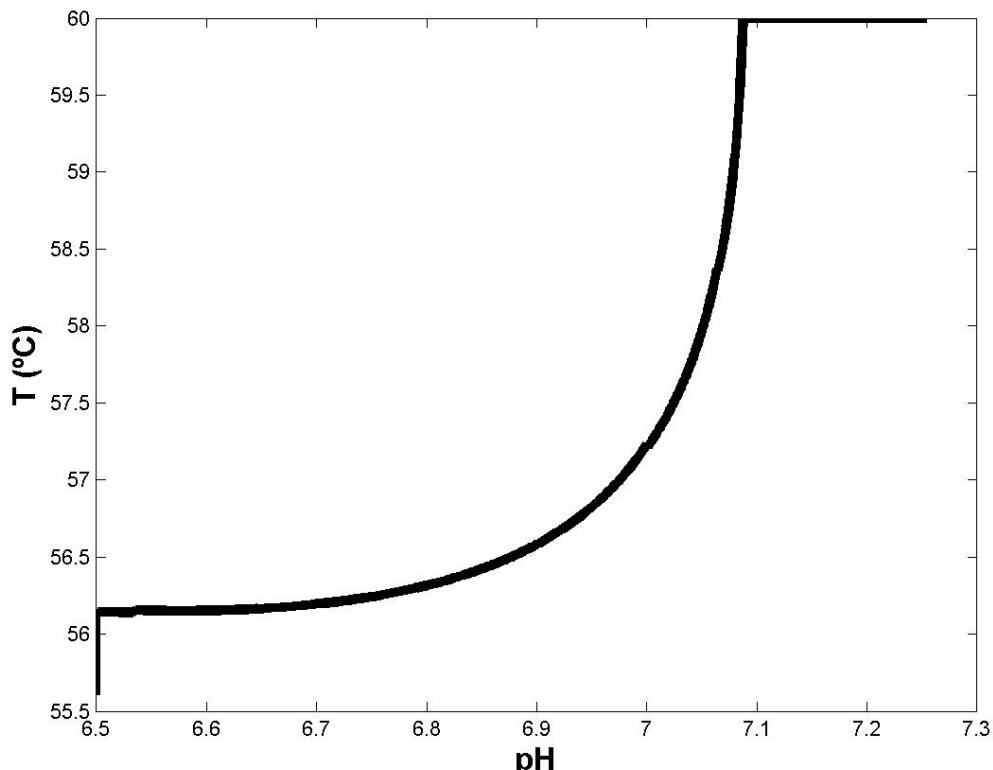


Figura 30. Conjunto de soluciones (pH,T) que minimizan la función objetivo con $\alpha \in [0,1]$

El nuevo frente arranca desde el óptimo individual que se obtuvo para el DH (6.5; 55.6°C), hasta el óptimo individual para SS (7.2, 60°C), de modo que todos los puntos intermedios ofrecen soluciones de compromiso entre ambos objetivos.

5. CONCLUSIONES

1. La harina de sangre se hidroliza enzimáticamente con Alcalasa 2.4 L en el rango de temperaturas de 50 a 60°C, pH entre 6.5 y 7.5 y relación enzima/sustrato del 5 al 10%
2. La aplicación de la técnica de la superficies de respuesta ha permitido estudiar la influencia de las condiciones de operación investigadas (pH, T y e/S) sobre las variables de respuesta medidas (grado de hidrólisis y contenido de sólidos en suspensión en el hidrolizado).
 - A pH=6.5, T=55,6°C y e/S =10% se maximiza el grado de hidrólisis, con un valor DH= 28%.
 - A pH=7.25, T=60°C y e/S =10% se minimiza el contenido en sólidos en suspensión, SS= 31%.

Los dos óptimos se encuentran alejados entre sí. Se ha encontrado que la influencia de las variables experimentales sobre las variables de respuesta suele ser opuesta, posiblemente debido a la incidencia de la rotura de enlaces peptídicos en la pérdida de la estructura cuaternaria del sustrato, dando lugar a la aparición de grupos hidrófobos insolubles, de modo que se plantea un conflicto entre dos objetivos individuales.

3. Se ha planteado una optimización multiobjetivo, que ha permitido obtener un conjunto de soluciones que suponen un compromiso entre el grado de hidrólisis obtenido y el contenido en materia insoluble. En función del peso relativo con que se dote a cada objetivo individual (DH y SS), se obtiene una solución al problema multiobjetivo, que permite tener un valor elevado del grado de hidrólisis, acorde con un alto contenido de aminoácidos libres en el hidrolizado final, junto con un contenido en sólidos en suspensión limitado.

6. BIBLIOGRAFÍA

Adler-Nissen Jens. *Enzymic hydrolysis of food proteins.* Novo Industri A/S Bagswaerd, Dinamarca. Elsevier Applied Science Publishers.

Belhocine D., Mokrane H., Grib H. Lounici H. Pauss A. Mameri N. *Optimization of enzymatic hydrolysis of haemoglobin in a continuous membrane bioreactor.* Chemical Engineering Journal 76 (2000) 189-196

Bolívar Bolívar J.M. *Obtención de fertilizantes enriquecidos en aminoácidos.* Proyecto fin de carrera (2002) Universidad de Granada

Chi-Yue Chang, Kuei-Ching Wu, Shu-Hua Chiang. *Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates.* Food Chemistry (2006)

Clark JT, Cutler LJ, O'Meara GM. *Solubilisation of bovine rumen and decolorisation of bovine blood by enzymic hydrolysis with Alcalase.* Meat Science 21(1987) 111-120.

Dolors Parés i Oliva. *Caracterització i revaloració de la fracció plasmàtica de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials.* Tesis doctoral depositada en la Universitat de Girona (2001).

Dubois V., Nedjar-Arroume N., Guillochon D. *Influence of pH on the Appearance of Active Peptides in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin.* Preparative Biochem. & Biotechnology, 35:85-102 (2005)

Eriksson, Caj. *Heme-iron-enriched amino acid and a process for the preparation of heme-iron-enriched amino acid.* US Patent 4.411.915 (1983)

Guadix A., Guadix E.M., Páez-Dueñas M.P., González Tello P., Camacho F. *Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas.* Ars Pharmaceutica , 41:1 79-89 (2000)

Hayley Halsall-Whitney, Jules Thibault. *Multi-objective optimization for chemical processes and controller design: approximating and classifying the Pareto Domain.* Computers and Chemical Engineering 30(2006) 1155-1168

Hydrolysis of the slaughter cattle blood by yeast porteases of Saccharomyces type. Annual International Congress of Meat Science and Technology 20-25(1995).

Ismail Hakki Boyaci. *A new approach for determination of enzyme kinetic constants using response surface methodology.* Bioch.Engineering Journal (2005)

I.Y.Kim y O.L. de Weck. *Adaptative weighted-sum method for bi-objective optimization: Pareto front generation.* Struct. Multidisc. Optim. 29, 149-158(2005)

Kapel Romain, Froidevaux R., Nedjar-Arroume Naima, Fertin-Bazus Anne, Dhulster P., Guillochon D. *Continuous production of a peptidic fraction containing*

the intermediate opioid peptide LVVh-7 for the hydrolysis of bovine haemoglobin in a continuous membrane reactor. Biotech. Appl. Biochem. (2003) 37, 317-324

L.Erikxon, E.Johansson, N.Kettaneh-Wold, C.Wikström, S.Wold. *Design of experiments. Principles and Applications.* Ed. Umetrics Academy (2000).

Man-Jin In, Hee Jeong Chae, Nam-Soon Oh. *Process development for heme-enriched peptide by enzymatic hydrolysis of haemoglobin.* Bioresource Technology 84(2002) 63-68

M.C. Márquez, M.A.Vázquez. *Modeling of enzymatic protein hydrolysis.* Process Biochemistry 35(1999) 111-117

M.Diniz Fabio y M. Martín Antonio. *Use of Response Surface Methodology to describe the combined effects of pH, temperature and e/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle.* International congress on Meat Science .

Mònica Toldrà i Alegret. *Revaloració de la fracció cel.lular de la sang de porc procedent d'excorxadors industrials.* Tesis doctoral depositada en la Universidad de Girona (2002)

Montgomery Douglas C.. *Diseño y análisis de experimentos.* Ed. Limusa (2002)

Pascal Dhulster, Romain Kapel, Renato Froidevaux, Naima Nedjar-Arroume, Anne Fertin-Bazus, Luc Choisnard, Didier Guillochon. *Advancement in intermediate opioid peptide production in an enzymatic membrane reactor assisted by solvent extraction.* Desalination (2002),148(1-3) , 221-226.

Postolache C, Oncescu T. *Kinetics of hemoglobin and casein hydrolysis catalyzed by Alcalase.* Rev Roumanie de Chimie 1989, 34:581-4

Rafael Romero Villafranca, Luisa Rosa Zúnica Ramajo. *Métodos Estadísticos en Ingeniería.* Editorial Universidad Politécnica de Valencia (2003).

Steinhardt, J. y Beychok, S. *Interaction of protein with hydrogen ions and other small ions and molecules.* The Proteins, vol(2), 139-304. New York Academic Press.

Ticu Elena-Loredana, Vercaigne-Marko Dominique, Huma Anca, Vlad A.,Toma O., Guillochon D. *A kinetic study of bovine haemoglobin hydrolysis by pepsin immobilized on a functionalized alumina to prepare hydrolysates containing bioactive peptides.* Biotechnol. Appl. Biochem. (2004) 39, 199-208

Vaghefi Nikta, Nedjaoum Fouzia, Guillochon Didier, Bureau François, Arhan Pierre, Bouglé Dominique.*Influence of the extent of haemoglobin hydrolysis on the digestive adsorption of heme iron. An in vitro study.*J.Agric. Food Chem (2002) 50, 4969-4973.