

Caracterización y propiedades funcionales de hidrolizados proteicos obtenidos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria

Trabajo Fin de Grado

**Grado en Ciencia y Tecnología de los
Alimentos**

Dirigido y tutorizado por:

**Rodrigo Melgosa Gómez y Oscar Benito Román
Área de Ingeniería Química**

Memoria presentada por:

Elisa Martínez Barbáchano

Febrero 2023



**UNIVERSIDAD
DE BURGOS**

Campus de Excelencia INTERNACIONAL

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO (1)**

**GRADO EN: CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.
CURSO: 2022/2023**

D. Rodrigo Melgosa Gómez y D. Óscar Benito Román., Tutores Académicos, informa de que el alumno D/Dña. Elisa Martínez Barbáchano, ha realizado el Trabajo Fin de Grado que lleva por título “Caracterización y propiedades funcionales de hidrolizados proteicos obtenidos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria”
bajo su tutela y considera que la memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a ..15... de febrero de 2023.

**MELGOSA
GOMEZ
RODRIGO -
71300481K** Firmado digitalmente por MELGOSA GOMEZ RODRIGO - 71300481K
Fecha: 2023.02.15 08:02:06 +01'00'

**BENITO
ROMAN
OSCAR -
71271700J** Firmado digitalmente por BENITO ROMAN OSCAR - 71271700J
Fecha: 2023.02.15 10:23:36 +01'00'

Fdo.: Rodrigo Melgosa Gómez.....

Fdo.: Óscar Benito Román.....

(1) Las memorias presentadas deberán contar con el visto bueno de los tutores. A tal efecto, **se incluirá en la contraportada este documento con la firma de los mismos**. (Regulación del reglamento interno de la facultad de ciencias para la gestión de la asignatura “Trabajo Fin de Grado” de la Facultad de Ciencias, aprobada en Junta de Facultad de 11 de febrero de 2022).

Índice

RESUMEN/ABSTRACT	1
1. Introducción.....	2
2. Objetivos	3
3. Materiales y Métodos	3
3.1. Materias primas.....	3
3.2. Preparación de los extractos de proteína	4
3.2.1. Hidrólisis mediante agua subcrítica	4
3.2.2. Hidrólisis enzimática.....	4
3.3. Caracterización de los extractos.....	5
3.3.1. Análisis CHNS.....	5
3.3.2. Grado de hidrólisis	5
3.3.3. Distribución de pesos moleculares (HPLC-SEC).....	5
3.4. Determinación de las propiedades tecno-funcionales de los extractos	6
3.4.1. Solubilidad (Método de Lowry)	6
3.4.2. Fluorescencia.....	6
3.4.3. Tensión superficial	7
3.4.4. Propiedades emulsionantes.	7
3.4.5. Medida del potencial Z (estabilidad de las emulsiones).....	7
3.5. Análisis estadístico.....	8
4. Resultados	8
4.1. Características de los extractos.	8
4.1.1. Composición y grado de hidrólisis	8
4.1.2. Distribución de pesos moleculares (HPLC-SEC).....	9
4.1. Solubilidad	9
4.2. Tensión superficial	12
4.3. Capacidad emulsionante y estabilidad de las emulsiones.	13
4.3.1. Capacidad emulsionante.....	13
4.3.2. Estabilidad de las emulsiones	14
4.4. Fluorescencia intrínseca e hidrofobicidad superficial.....	19
4.4.1. Fluorescencia intrínseca.	19
4.4.2. Hidrofobicidad superficial	20
5. Conclusiones.....	21
6. Bibliografía	22

RESUMEN/ABSTRACT

En la industria alimentaria, uno de los mayores problemas que se está intentando trabajar es la reducción de la generación de residuos, con el fin de conseguir un desarrollo sostenible, así como para aumentar la rentabilidad económica del proceso industrial. En casos como el de la industria pesquera, los subproductos generados pueden representar más del 50% de la materia prima inicial. Teniendo en cuenta el contenido proteico de estos subproductos, se ha propuesto la obtención de hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos dado que son una buena fuente para la producción de nuevos ingredientes con aplicaciones tecnológicas y funcionales en la industria alimentaria. El presente trabajo se centra en la caracterización de hidrolizados proteicos obtenidos mediante hidrólisis con agua subcrítica (sCW) e hidrólisis enzimática, ya que son procedimientos con un enfoque amigable con el medio ambiente.

Los resultados mostraron que se obtuvo un mayor grado de hidrólisis en el caso de los extractos de harina de pescado y sus fracciones hidrolizadas por sCW ($241,80 \pm 9,87$ a $175,80 \pm 1,21$ meq Leu), esto puede deberse a la mayor capacidad hidrolítica del sCW. Como se ha observado en el análisis HPLC-SEC, estas muestras presentan moléculas de tamaño mucho menor que en el resto de las muestras y también son las que mayor capacidad emulsionante presentan. Por otro lado, respecto a los resultados de solubilidad, se observa que los resultados menores se obtuvieron con las muestras de harina de pescado y fracción insoluble hidrolizadas por sCW ($71,06 \% \pm 18,38$ y $65,18 \% \pm 1,34$ respectivamente), lo que puede ser debido a la alta desnaturalización de la proteína y la exposición de grupos hidrofóbicos que como podemos observar en el caso del experimento de fluorescencia que estas muestras son las que mayor hidrofobicidad superficial presentan ($K_{SV} = 12,138$ y $12,883$ respectivamente). Finalmente, en cuanto a los resultados de tensión superficial, los mayores valores se obtuvieron con las muestras de harina de pescado total (sCW = $52,59 \pm 0,18$ y Alc = $54,89 \pm 0,62$) que coincide con las muestras con menor estabilidad emulsionante.

In the food industry, one of the major problems being addressed is the reduction of waste generation, in order to achieve sustainable development, as well as to increase the economic profitability of the industrial process. In cases such as the fishing industry, the by-products generated can represent more than 50% of the initial raw material. Taking into account the protein content of these by-products, it has been proposed to obtain protein hydrolysates and bioactive peptides since they are a good source for the production of new ingredients with technological and functional applications in the food industry. The present work focuses on the characterization of protein hydrolysates obtained by subcritical water hydrolysis (sCW) and enzymatic hydrolysis, since these are environmentally friendly procedures.

The results showed that a higher degree of hydrolysis was obtained in the case of fish meal extracts and their fractions hydrolyzed by sCW (241.80 ± 9.87 to 175.80 ± 1.21 meq Leu), this may be due to the higher hydrolytic capacity of sCW. As observed in the HPLC-SEC analysis, these samples present molecules of much smaller size than in the rest of the samples and they are also the ones with the highest emulsifying capacity. On the other hand, regarding the solubility results, it is observed that the lowest results were obtained with the fish meal and insoluble fraction samples hydrolyzed by sCW ($71.06 \% \pm 18.38$ and $65.18 \% \pm 1.34$ respectively), which may be due to the high denaturation of the protein and the exposure of hydrophobic groups that as we can observe in the case of the fluorescence experiment that these samples are the ones with the highest surface hydrophobicity ($K_{SV} = 12.138$ and 12.883 respectively). Finally, as for the surface tension results, the highest values were obtained with the total fish meal samples (sCW = 52.59 ± 0.18 and Alc = 54.89 ± 0.62) which coincides with the samples with the lowest emulsifying stability.

1. Introducción

La producción de la industria pesquera a nivel mundial ha venido creciendo en los últimos años. El consumo de pescado alcanzó los 214 Mt. en 2020 [1]. En paralelo, los subproductos derivados de la pesca siguen la misma tendencia, con una producción en 2020 de más de 20 Mt. Uno de los subproductos más abundantes es la harina de pescado (FM), con una producción mundial de 16 Mt destinada principalmente a la acuicultura [1].

La harina de pescado es una harina rica en proteína producida a partir de peces y partes de peces no destinados a consumo humano [1]. Las proteínas de pescado presentan un alto valor biológico, por lo que nutricionalmente son muy atractivas para su reutilización en la industria alimentaria. Además, la hidrólisis de estas proteínas para producir péptidos bioactivos suscita un gran interés, pues estos compuestos son capaces de ejercer efectos beneficiosos para la salud [2] presentando un gran potencial nutracéutico. Algunos péptidos bioactivos derivados de proteínas de pescado presentan gran capacidad antioxidante que se ha relacionado con la prevención de varias enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades coronarias, trastornos inflamatorios, degeneración neurológica y envejecimiento [3]

Por otra parte, el consumo de bebidas derivadas de soja también ha experimentado un fuerte aumento en los últimos años. Se estima que el 2 % de la producción mundial de soja, que alcanza los 350 Mt, se emplea en la elaboración de estas bebidas [4], y que por cada kg de haba de soja empleada, se genera aproximadamente 1 kg de okara [5]. Este subproducto, que consiste en harina de soja a la que se le han extraído diversos compuestos solubles en agua, tiene una composición nutricional muy interesante, con 24,5–37,5 g proteína/100 g, 9,3–22,3 g lípidos/100 g, y 14,5–55,4 g fibra/100 g (base seca). Además, la okara contiene compuestos fenólicos e isoflavonas (0,14 g/100 g) con actividad antioxidante y fitoestrogénica [6]. La hidrólisis de las proteínas de okara también genera péptidos bioactivos, con alta actividad antioxidante y antihipertensiva gracias a la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina [7]. Por su parte, la fracción lipídica es rica en ácidos grasos poli-insaturados de la serie omega-6.

Además de las interesantes propiedades beneficiosas para la salud de estos péptidos, la industria alimentaria también está interesada en las propiedades tecnofuncionales de los mismos. En bibliografía existen numerosos estudios [8]–[10], que demuestran las propiedades de solubilidad, propiedades tensioactivas, capacidad espumante y emulsificante, etc., que presentan algunos péptidos de origen animal o vegetal. Estas propiedades tecnológicas y funcionales, unidas a las propiedades bioactivas, hacen a estos compuestos muy interesantes para su incorporación como ingredientes en la industria alimentaria.

Los péptidos con propiedades bioactivas y tecnofuncionales se consiguen generalmente por hidrólisis. Existen varias rutas tecnológicas, la más tradicional es la hidrólisis química mediante ácidos o álcalis [11], pero en las últimas décadas se han desarrollado otros métodos menos agresivos y más respetuosos con el medio ambiente, como la hidrólisis enzimática o el empleo de agua subcrítica (sCW).

El agua subcrítica (sCW) es agua que se encuentra a temperaturas por encima del punto de ebullición a presión atmosférica (100°C) y por debajo del punto crítico (374°C), manteniéndose en estado líquido gracias a las condiciones de presión que se le aplica (condiciones de trabajo 150 bar y 180°C; Figura 1 izq.). En estas condiciones, se produce la ruptura de los puentes de hidrógeno, de manera que las propiedades físico-químicas cambian notablemente (Figura 1 dcha.).

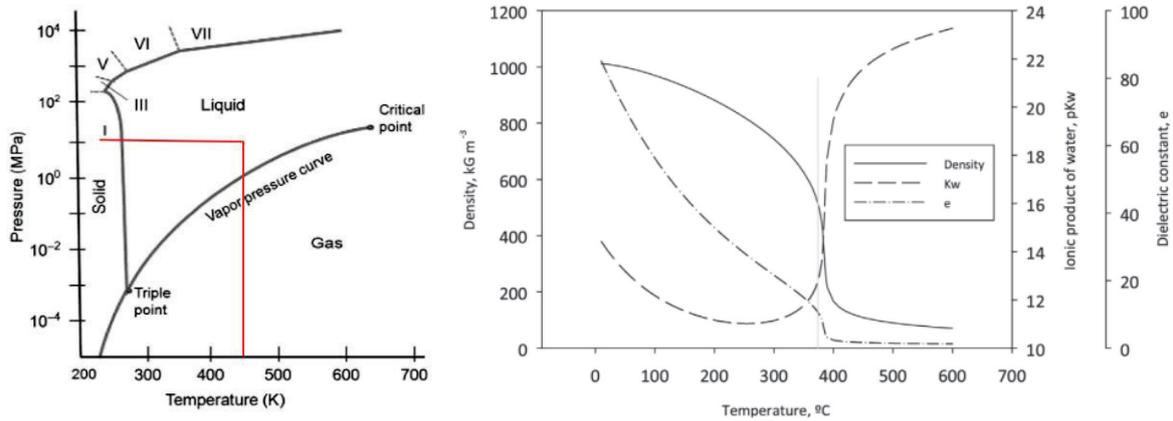


Figura 1: (izq) Diagrama de fases del agua. (Fuente[12]) y (dcha) Propiedades del agua subcrítica y supercrítica en torno al punto crítico (Fuente [12]).

En condiciones subcríticas, la constante dieléctrica disminuye, permitiendo que el sCW se comporte como un disolvente orgánico [12]. También se produce un aumento de la capacidad calorífica y una disminución de la viscosidad y la tensión superficial. Asimismo, el pH del agua disminuye y la constante de disociación K_w del sCW aumenta 3 órdenes de magnitud en comparación con la del agua a temperatura ambiente. Gracias a estos cambios, el sCW adquiere las propiedades idóneas para que actuar como solvente, reactivo y catalizador en procesos de hidrólisis [12].

2. Objetivos

In the present work there are three objectives:

- To compare the protein extracts obtained by hydrolysis by sCW with those obtained by enzymatic hydrolysis in terms of techno-functional properties.
- To determine the functional properties of the different extracts and their suitability for application in the food industry.
- To compare the protein extracts obtained by sCW hydrolysis of proteins of animal origin (fish meal and its fractions) and vegetable origin (okara) in terms of techno-functional properties.

In order to achieve these objectives, the following partial objectives are established:

- Hydrolysis and fractionation of extracts from fishmeal and okara.
- Determination of functional properties of the extracts obtained.
- Search of information in order to recognize the value of the by-products of the food industry, the advantages of their use, as well as to recognize the technologies used to obtain extracts and to compare with the results obtained.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materias primas

En este trabajo, se han utilizado dos subproductos alimentarios ricos en proteína, uno de ellos de origen animal (harina de pescado) y otro vegetal (okara). La harina de pescado se ha obtenido de Industrias del Noroeste S.A.U. (A Coruña, España) y la okara ha sido donada por Frías Nutrición S.A.U. (Burgos, España).

Además, basándonos en estudios previos [13], la harina de pescado se ha fraccionado en proteína soluble en agua a 80 °C y proteína insoluble.

3.2. Preparación de los extractos de proteína

3.2.1. Hidrólisis mediante agua subcrítica

Para la obtención de los hidrolizados de proteína mediante agua subcrítica (sCW), se utilizó un reactor discontinuo de tanque agitado con una capacidad de 500mL. El reactor está diseñado por el grupo de investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental (BIOIND) y construido en acero inoxidable de calidad alimentaria (SS-316) por Addeffi S.L. (Asturias, España). La temperatura en el interior del reactor se controla mediante una resistencia de abrazadera de 2000 W de potencia y la presión mediante un sistema de tuberías de alta presión y válvulas que permiten inyectar gases presurizados (CO₂ y N₂, principalmente). Las especificaciones técnicas del reactor permiten trabajar a un máximo de 150 bar y 300 °C.

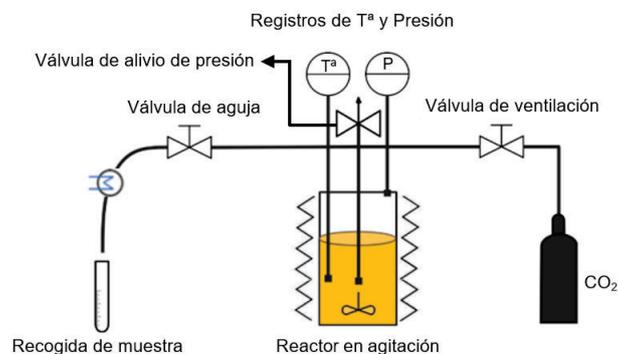


Figura 2: Reactor a escala de laboratorio. (Fuente: elaboración propia basada en [14])

Para obtener los extractos estudiados en este trabajo, se introdujeron en el reactor unos 20 g de la materia prima correspondiente (harina, proteína soluble, proteína insoluble, okara) y agua destilada en proporción 1:10. A continuación, se cerró el reactor y se presurizó hasta 50 bar con CO₂ a alta presión (Air Liquide S.A.), lo que permite poder alcanzar temperaturas superiores a 100°C y que el agua se mantenga en estado líquido. Una vez conectada la resistencia de abrazadera, la temperatura de trabajo de 180 °C se alcanzó en 30 min. Transcurridas 5 h y a través de una válvula de toma de muestras, se obtuvo el extracto hidrolizado de proteína en una trampa fría. El extracto obtenido se filtró a vacío con papel de filtro (Whatman no. 5) y se congeló a -18°C. Por último, se liofilizó y se mantuvo en refrigeración (4°C) hasta futuros análisis.

3.2.2. Hidrólisis enzimática

Para la obtención de los hidrolizados de proteína mediante tecnología enzimática, la materia prima correspondiente se diluyó en tampón fosfato ajustado previamente a pH 8 (NaH₂PO₄ · H₂O + Na₂HPO₄ · 12H₂O; VWR ProLabo) en una proporción del 10%.

A continuación, la mezcla se llevó a un reactor de vidrio encamisado termostatzado a 60 °C y se añadieron 225 U (unidades de actividad enzimática) de Alcalase 2.5L (Novozymes) (204µL). Según estudios previos del grupo BIOIND, las condiciones óptimas de operación para esta enzima y estos sustratos son 60 °C y pH = 8. Transcurridas 24 h, la reacción se

detuvo mediante inmersión en hielo y se obtuvo el extracto hidrolizado de proteína. El extracto obtenido se filtró a vacío con papel de filtro (Whatman no. 5) y se congeló a -18°C . Por último, se liofilizó y se mantuvo en refrigeración (4°C) hasta futuros análisis.

3.3. Caracterización de los extractos

3.3.1. Análisis CHNS

Para la determinación del contenido de C, N, H, S y O, se realizó un microanálisis elemental de los extractos obtenidos tras la hidrólisis. Este análisis se lleva a cabo en un micro analizador elemental Orgánico Thermo Scientific Modelo FLASH 2000 y consiste en la oxidación por combustión de las muestras ($T = 950\text{-}1100^{\circ}\text{C}$, atm de O_2 puro) para obtener gases simples (CO_2 , N_2 , H_2O y SO_2) que son transportados mediante He (Gas portador) a través de un horno de reducción y hasta una columna cromatográfica, esta separa los elementos que posteriormente pasan por un detector de conductividad térmica. La señal obtenida es directamente proporcional a la concentración de cada componente, el resultado se da en porcentaje respecto al peso [15].

3.3.2. Grado de hidrólisis

El grado de hidrólisis de los hidrolizados de proteína se determinó mediante el método de ninhidrina, un método colorimétrico que mide la concentración de aminoácidos, aminas primarias y secundarias en disoluciones acuosas. El reactivo ninhidrina reacciona con α -aminoácidos en un rango de $\text{pH} = 4\text{-}8$, formando un compuesto de coloración azul o violeta con un máximo de absorbancia a 570 nm.

En un tubo de ensayo roscado, se tomaron 2 mL de disolución de hidrolizado de proteína junto con 1 mL de reactivo de ninhidrina (Sigma Aldrich) en atmósfera de N_2 , pues el reactivo se oxida rápidamente en contacto con el aire dando un color amarillento. La mezcla se agitó en vórtex 10 s y se incubó a 100°C durante 10 min. Una vez fría, se añadieron 5 mL de etanol 95 % y se midió la absorbancia a 570 nm [16]. Paralelamente, se realizó una curva de calibrado con disoluciones del aminoácido mayoritario en la materia prima, Leucina, en ácido acético 0,05 % a diferentes concentraciones. Los resultados se expresan en equivalentes de Leucina liberados/L [17].

3.3.3. Distribución de pesos moleculares (HPLC-SEC)

La distribución de pesos moleculares de los hidrolizados de proteína fue analizada mediante HPLC-SEC (*Size Exclusion Chromatography*). El análisis se realizó en un equipo Agilent 1260 Infinity II, con inyector automático, horno y detector de índice de refracción (RID).

Los hidrolizados de proteína, disueltos en agua ultrapura a una concentración de 10 g/L y previamente filtrados (Scharlab $0,22\ \mu\text{m}$), se inyectaron en una microcolumna Proteema (PSS – Polymer Standards Science, $\text{Ø}4,6 \times 250\ \text{mm}$), con una porosidad de $100\ \text{Å}$ y tamaño de partícula $3\ \mu\text{m}$. Como fase móvil, se utilizó acetato de amonio ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) 0,01 M, con un caudal de 0,3 mL/min. Las temperaturas de columna y detector se mantuvieron constantes a 35°C .

La adquisición de datos y el análisis de los cromatogramas obtenidos se realizó mediante el software OpenLab CDS 3.2 y el add-on para GPC-SEC. El peso molecular de los picos observados en cada cromatograma se calculó mediante comparación del tiempo de retención con los de varios patrones de pululano (PSS) de peso molecular conocido (342-224000 Da).

3.4. Determinación de las propiedades tecno-funcionales de los extractos

3.4.1. Solubilidad (Método de Lowry)

La determinación de la solubilidad de los hidrolizados de proteína se realizó según la metodología descrita por Hamada et al y Zhang et al. En primer lugar, se obtuvieron disoluciones acuosas a distintos pHs (2, 4, 7 y 10) mediante ajuste con NaOH o HCl, según correspondiera. A continuación, 0,1 g de hidrolizado de proteína fueron dispersados en 20 mL de estas disoluciones. La mezcla se agitó en vórtex durante 15 s y se centrifugó a 8000 g durante 30 min. Por último, se recogió un volumen conocido del sobrenadante se analizó por el método de Lowry [18] [19].

El método de Lowry es un método colorimétrico muy utilizado para la determinación de proteína que consta de dos reacciones: (1) reducción del ion Cu^{2+} que en condiciones alcalinas forma un complejo con enlaces peptídicos (reacción de Biuret) y (2) reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu por parte del complejo de cobre, lo que deriva en un viraje a color azul de la muestra con absorción máxima a 750 nm [20]. La concentración de proteína en la muestra se determina mediante calibrado con concentraciones conocidas de otra proteína estándar, en este caso 0,02-0,25 g/L de seroalbúmina bovina (BSA) (Europa Bioproducts Ltd).

El sobrenadante recogido se diluyó 1:50 (100 μL de sobrenadante + 4,90 mL de agua destilada). Se tomó 1 mL de muestra y se añadieron 5 mL del reactivo de Lowry (Tartrato de potasio-sodio [2% en agua]; Sulfato de cobre [2% en agua]; Carbonato de sodio [2% en NaOH 0,1M] en proporción 1:1:100). La mezcla se mantuvo 15 min en oscuridad y a continuación se añadieron 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu [1:3]. Transcurridos 30 min en oscuridad, se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (modelo y fabricante) a una T^a constante de 25°C.

3.4.2. Fluorescencia

3.4.2.1. Fluorescencia intrínseca

Los espectros de fluorescencia intrínseca de los hidrolizados de proteína se obtuvieron según el método descrito por Zhao et al [21] mediante un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent). Los hidrolizados de proteína liofilizados se disolvieron en tampón fosfato 10 mM (pH = 6,8) a una concentración de 0,5 g/L. Con el fin de minimizar la interferencia de los residuos de tirosina en los espectros de emisión, la longitud de onda de excitación se fijó a 280 nm y los slit de emisión y excitación se fijaron en 5 nm. Los espectros de emisión se obtuvieron desde los 300 hasta los 800 nm.

3.4.2.2. Determinación de la hidrofobicidad superficial de los hidrolizados de proteína (quenching)

La determinación de la hidrofobicidad superficial de los hidrolizados de proteína se realizó según el método de inhibición (quenching) de la fluorescencia descrito por Illera et al. [22], utilizando un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Agilent).

Como agente inhibidor, se utilizó KI 2M disuelto en tiosulfato de sodio 0,1 M que evita la formación de triyoduro. En 2 cubetas para espectrofluorescencia, se añaden 2 mL de la disolución de hidrolizado de proteína utilizada en la determinación de la fluorescencia intrínseca y se van añadiendo alícuotas de KI (20-600 μL) a una de las cubetas mientras que a la otra se le añade el mismo volumen de agua destilada para tener en cuenta el efecto de dilución producido al añadir el KI.

Cuanto mayor es el volumen de agente inhibidor (quencher) añadido, menor será la intensidad fluorescente percibida. El proceso de extinción de la fluorescencia se evalúa mediante la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 1).

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (1)$$

3.4.3. Tensión superficial

La tensión superficial de las disoluciones de hidrolizado de proteína a una concentración del 2,1 % (2 g de hidrolizado en 95 mL de agua destilada), se midió mediante el método de gota colgante en un tensiómetro óptico Thetta Attension (Biolin Scientific).

En cada ensayo, realizado a temperatura ambiente (20 °C), se crea una gota de 4 µL en la punta de una jeringa micrométrica. Para obtener las medidas, el equipo mide el radio y el volumen de la gota durante 10 s y calcula la tensión superficial mediante el software One Attension. Cada ensayo consta de unas 150 medidas y cada muestra se midió por triplicado [23].

3.4.4. Propiedades emulsionantes.

3.4.4.1. Preparación de emulsiones:

La formulación de las emulsiones se realizó en base a estudios previos del grupo [REF]. En primer lugar, se disuelven 2 g de hidrolizado de proteína seco en 95 mL de agua. Tras agitación hasta su completa disolución, se añaden 3 g de aceite vegetal y la mezcla se homogeniza en un homogenizador-dispersor (Micra D-9) a 15000 rpm durante 1,5 min. Esta pre-emulsión se lleva inmediatamente a un microfluidizador (Microfluidics mod. LM20). En este equipo, el fluido se presuriza hasta 2000 bar y se hace pasar por una cámara de interacción donde la alta presión se transforma en fuerzas de cizalladura [24], capaces de reducir el tamaño de gota hasta obtener micro y nano emulsiones. En total, se realizaron 7 ciclos de homogenización para cada emulsión, hasta obtener un tamaño de gota constante.

Tras su preparación, las emulsiones preparadas se almacenaron en condiciones de oscuridad y refrigeración a 4 °C durante 21 días.

3.4.5. Medida del potencial Z (estabilidad de las emulsiones).

El potencial Z de las emulsiones obtenidas mediante homogenización a alta presión se determinó en un Zeta Sizer Nano Z (Malvern Instruments Inc.). Cada emulsión se diluyó 1:80 con agua ultrapura y, mediante una micro jeringa, se introdujo en la célula de medida previamente llena con 800 µL de agua ultrapura. Los resultados obtenidos son la media de 10 repeticiones por muestra, con 50 ciclos de estabilización en cada repetición y descanso de 5 segundos entre medidas.

La determinación del potencial zeta es una técnica de caracterización que estima las cargas superficiales de soluciones coloidales. Respecto a los resultados que se obtienen en el análisis, alto valor positivo o negativo de potencial Z indica una buena estabilidad física debido a la repulsión electrostática de las partículas, sin embargo, en el caso de obtener valores cercanos a 0, se traduce en la posibilidad de formar agregados o flóculos debido a la ausencia de cargas, así como a las interacciones de Van Der Waals [25]

3.4.5.1. Medida de la distribución de tamaños de gota

La medida de la distribución del tamaño de gota de las emulsiones se realizó en el equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Inc.), capaz de determinar la distribución del tamaño de gota con un rango comprendido entre 20 nm y 2000 µm mediante difracción láser, midiendo

la intensidad de la luz dispersada por la muestra. Los resultados se obtienen como el diametro equivalente de una esfera equivalente en volumen (Ecuacion 2) [24].

$$D[4,3] = \frac{\sum_{i=1}^n D_i^4}{\sum_{i=1}^n D_i^3} \quad (2)$$

Las medidas se realizaron después de cada ciclo de homogenización a alta presión con el objetivo de determinar los ciclos necesarios para obtener una emulsión con tamaño de gota constante. Tras los ciclos necesarios, se midió la distribución de tamaños de gota final de cada emulsión y se observó la evolución de las emulsiones almacenadas en oscuridad y refrigeración durante 21 días realizando medidas en los días 0, 1, 2, 3, 7, 14 y 21.

3.5. Análisis estadístico

Los valores se expresaron como la media \pm la desviación estándar, todas las medidas se han realizado por triplicado, solo indicación. El análisis estadístico de los datos se ha realizado con el software Statgraphics 19 centurion, se realizó un análisis de varianza (Diferencia mínima significativa de Fisher) con el fin de determinar la significancia de las diferencias, estableciendo un p-valor de 0,05.

4. Resultados

4.1. Características de los extractos.

4.1.1. Composición y grado de hidrólisis

La composición elemental (CHNS) de los extractos se recoge en la Tabla X. A partir del contenido de N y utilizando el factor de conversión general ($F = 6,25$) o específico para cada materia prima, se ha calculado el contenido de proteína de los diferentes hidrolizados.

Adicionalmente, en la Tabla 1 se presenta el grado de hidrólisis de los hidrolizados de proteína. Este parámetro, definido como el número de péptidos liberados (enlaces peptídicos rotos) durante la hidrólisis, determina la extensión de las reacciones hidrolíticas ocurridas, bien durante el tratamiento con sCW o en el tratamiento enzimático con Alcalase. Generalmente, el grado de hidrólisis es un indicador que se relaciona con el tamaño, composición de aminoácidos y la actividad biológica de los péptidos liberados durante la hidrólisis [26]. El grado de hidrólisis se midió por el método de ninhidrina y los resultados obtenidos se expresan como meq de Leu liberados (mM).

Como podemos observar en la Tabla 1, el contenido de proteína determinado mediante análisis elemental oscila entre el 45 y el 90 % del total del extracto seco, dependiendo de la muestra y el factor de conversión empleado. Estas diferencias en el contenido de proteína, así como las impurezas acompañantes, pueden ser determinantes en las propiedades tecnofuncionales de los hidrolizados.

En cuanto al grado de hidrólisis (GH) expresado en meq de Leu, podemos observar que la hidrólisis con sCW libera más grupos amino al medio que la hidrólisis enzimática con Alcalase para el mismo tipo de muestra. Con estos resultados se comprueba que el tratamiento con sCW a 180 °C durante 5 h provoca una mayor hidrólisis de las proteínas presentes en la muestra que el tratamiento enzimático con Alcalase a 60 °C durante 24 h.

Por otra parte, se observa que el hidrolizado obtenido a partir de okara tras el tratamiento sCW a 180 °C contiene una baja cantidad de grupos amino libres. Esto puede deberse a la mayor resistencia de la proteína vegetal a la hidrólisis por esta vía, que puede ser intrínseca

o también debida al efecto protector de la matriz lignocelulósica presente en biomasa de origen vegetal. También se ha de tener en cuenta que el hidrolizado de okara tiene una menor concentración de proteína que la harina de pescado y sus fracciones.

Tabla 1: Grado de hidrólisis y composición proteica de las muestras. (F.E: Factor específico para conversión de N en proteína. F.E.harina de pescado = 5,5; F.E.okara = 6,07.

Muestra	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	Proteína (%)		GH (meq Leu)
					F = 6.25	F.E.	
Hidrólisis sCW							
Harina de pescado	44,9 ± 0,3	7,4 ± 0,3	13,5 ± 0,2	n.d.	84,5 ± 1,4	74,4 ± 1,2	242 ± 9
Fr. soluble	34,1 ± 0,4	5,4 ± 0,1	11,9 ± 0,1	n.d.	74,1 ± 0,6	65,2 ± 0,5	122 ± 1
Fr. insoluble	50,6 ± 0,1	7,8 ± 0,1	14,7 ± 0,1	n.d.	91,5 ± 0,7	80,6 ± 0,6	176 ± 1
Okara	50,2 ± 0,2	6,3 ± 0,1	9,7 ± 0,1	n.d.	60,3 ± 0,6	58,6 ± 0,6	21,6 ± 0,4
Hidrólisis enzimática							
Harina de pescado	34,2 ± 0,6	5,6 ± 0,1	10,7 ± 0,1	n.d.	66,6 ± 0,5	58,6 ± 0,5	46,2 ± 0,5
Fr. soluble	28,1 ± 0,70	4,6 ± 0,2	9,6 ± 0,7	n.d.	60,0 ± 4,4	52,8 ± 3,9	61,4 ± 0,5
Fr. insoluble	30,2 ± 0,7	4,8 ± 0,1	8,3 ± 0,1	n.d.	52,0 ± 0,3	45,7 ± 0,2	17,2 ± 0,8

4.1.2. Distribución de pesos moleculares (HPLC-SEC)

Como podemos observar en la Figura 3, los tiempos de retención de los fragmentos grandes y medianos son similares, sin embargo, como podemos observar en los casos de las muestras hidrolizadas por sCW se obtienen tiempos de retención mayores a partir de los 11 minutos (<342 kDa), esto nos indica que con la hidrólisis por sCW se obtiene una mayor cantidad de fragmentos de menor tamaño, lo cual coincide con el mayor grado de hidrólisis detectado por el método de ninhidrina (Tabla 1).

4.1. Solubilidad

La solubilidad es una de las propiedades funcionales cuya determinación tiene mayor impacto en el uso de hidrolizados proteicos en la industria alimentaria. Esto se debe a que otras propiedades funcionales como la textura y la capacidad emulsionante generalmente, requiere que la proteína sea soluble en el medio [27].

La solubilidad de una proteína es el resultado del equilibrio entre las interacciones hidrofóbicas (favorecen las interacciones proteína-proteína y que disminuyen la solubilidad) y las interacciones iónicas (favorecen las interacciones proteína-agua y mejoran la solubilidad). Este equilibrio depende de muchos factores, por un lado, tenemos la hidrofobicidad y la carga de los aminoácidos, así como, la conformación de la proteína y las propiedades superficiales. Por otro lado, cabe destacar que las proteínas más grandes (en este caso en estado nativo) son menos solubles que las más pequeñas (proteína hidrolizada). Finalmente, otras propiedades que pueden influir en la solubilidad son las propiedades del medio, esto está directamente relacionado con el punto isoeléctrico (pI) de las proteínas, dado que, cuando más cercano este el medio al pI se verán más favorecidas las interacciones proteína-proteína y por tanto la solubilidad será menor y la precipitación de las proteínas será más probable [28].

En bibliografía [29] aparecen numerosos estudios que demuestran que la hidrólisis de la muestra favorece la solubilidad de la proteína dado que mediante estos procesos las proteínas se fraccionan y se obtienen grupos ionizables, proteínas más expuestas y de menor tamaño.

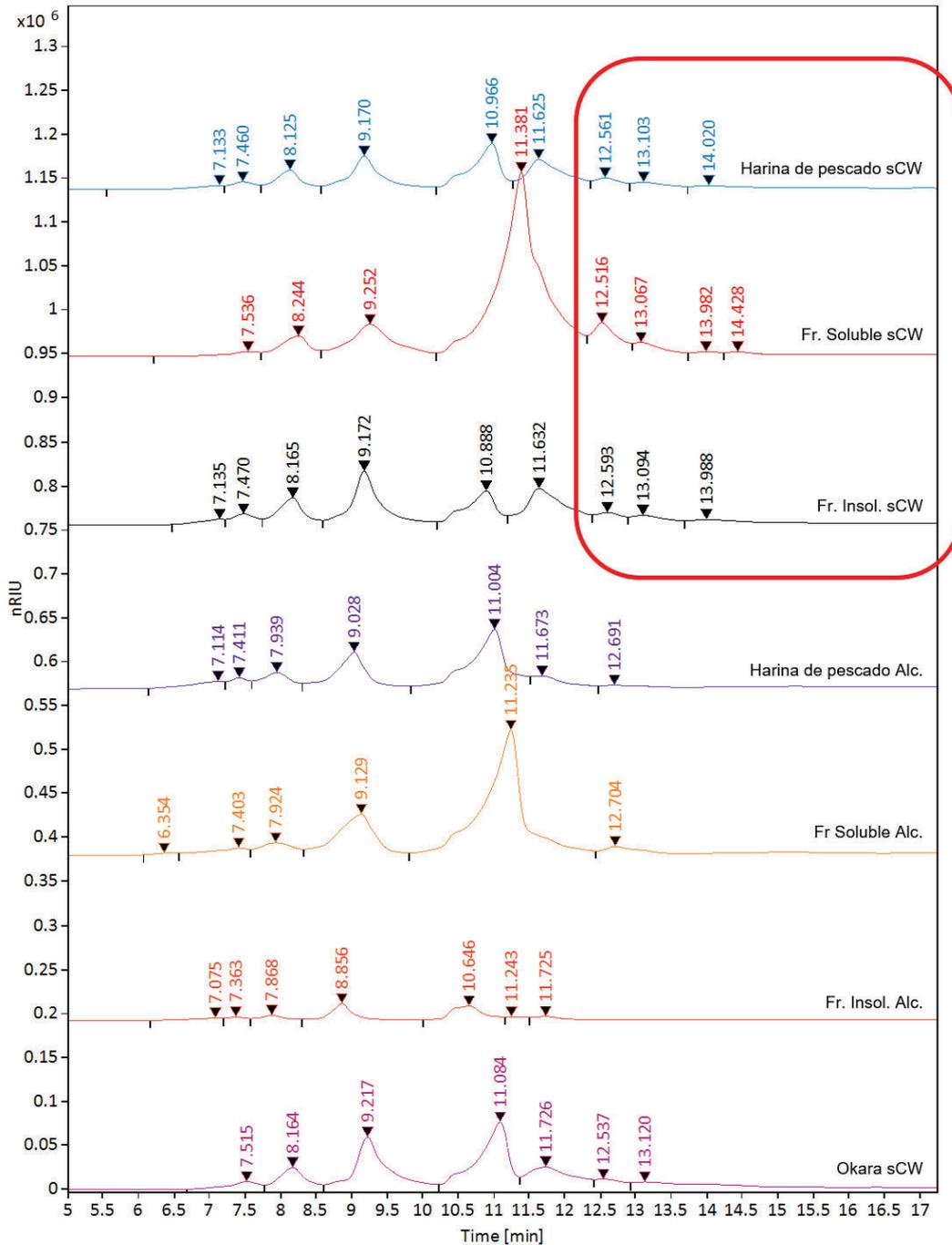


Figura 3. Perfiles cromatográficos HPLC-SEC de las muestras de hidrolizados de proteína estudiadas en este trabajo

Los resultados de solubilidad de los hidrolizados de proteína a distintos pHs se muestran en la Figura 4. Si comparamos por fracciones, podemos observar que la fracción de proteína soluble hidrolizada es la que mayor solubilidad presenta en el rango de pH analizado, con valores cercanos al 100 %. Esto puede deberse a que la parte soluble de la proteína tiene más grupos polares ionizables que el resto de las fracciones [30], lo que daría lugar a un mayor número de interacciones intermoleculares de naturaleza iónica. También la propia la

naturaleza de la proteína de partida puede afectar a la solubilidad. Respecto al efecto del pH en la solubilidad, podemos observar que el óptimo para la fracción soluble hidrolizada con Alcalase es pH 7, con una solubilidad del 99,1 %, mientras que el óptimo en la fracción soluble tratada con sCW es pH 10, con una solubilidad de 98,8 %. Si bien el efecto del pH en esta fracción es poco importante.

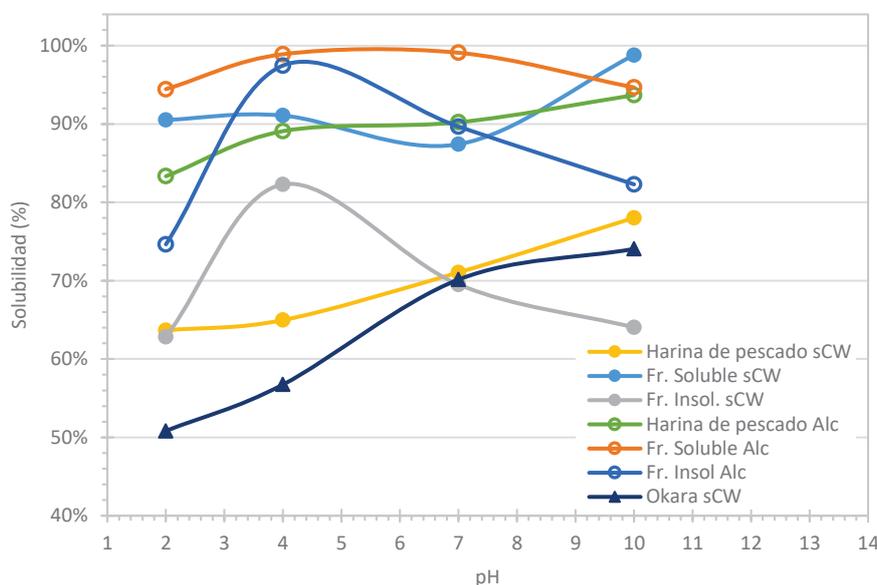


Figura 4. Evolución de la solubilidad de las muestras de hidrolizado de proteína a diferentes pH. Los hidrolizados se han obtenido mediante hidrólisis con agua subcrítica (sCW) e hidrólisis enzimática con Alcalase (Alc).

En el caso de la fracción insoluble, observamos un mayor efecto del pH del medio en la solubilidad, oscilando esta entre el 82 – 97 % en el caso de la hidrólisis con Alcalase y entre el 64 – 82 % en el hidrolizado obtenido mediante sCW, dependiendo del pH. El óptimo de solubilidad para ambos tratamientos se obtuvo a pH 4, con una solubilidad del 91 y el 77 % para Alcalasa y sCW, respectivamente. Por norma general, los hidrolizados obtenidos a partir de la fracción insoluble presentan menor solubilidad que los obtenidos a partir de la fracción soluble en las mismas condiciones de hidrólisis (sCW o Alcalase). La naturaleza del material de partida puede afectar a la solubilidad, ya que la fracción insoluble de proteína presenta mayor proporción de residuos hidrofóbicos, menos solubles y con mayor tendencia a establecer interacciones proteína-proteína insolubles que otros grupos de naturaleza polar [31], que serán mayoritarios en la fracción de proteína soluble.

Por otra parte, la harina de pescado hidrolizada enzimáticamente y tratada con sCW y la okara siguen una tendencia similar: la solubilidad de los hidrolizados aumenta con el pH. En el caso de la harina de pescado, la solubilidad aumenta desde el 60 y 80 % a pH 2 hasta el 75 y 95 % a pH 10, para Alcalase y sCW, respectivamente. Por su parte, el hidrolizado de okara sigue esa misma tendencia aunque con menor solubilidad, aumenta desde el 50 % a pH 2 hasta el 75 % a pH 10. Varios estudios [32] indican que la baja solubilidad de proteínas y derivados a pH ácido se podría atribuir a la formación de agregados proteicos por desnaturalización. Generalmente, a un pH alcalino alto se forman iones carboxilo y aminas desprotonadas, que originan fuerzas repulsivas entre proteínas y aumentan las interacciones proteína-agua, por lo que aumenta la solubilidad [33].

Por último, cabe destacar que la hidrólisis enzimática con Alcalase consigue mayor solubilidad que el tratamiento con sCW, tanto en la harina de pescado como en sus fracciones soluble e insoluble. Aunque el tratamiento con sCW consigue un mayor grado de hidrólisis, con

fragmentos más pequeños y a priori más solubles, es posible que las altas temperaturas alcanzadas en sCW provoquen una mayor desnaturalización proteica y una mayor exposición de los grupos hidrofóbicos, lo que conduciría al aumento de interacciones proteína-proteína, dando lugar a partículas insolubles [34].

4.2. Tensión superficial

Entre los distintos usos que se dan a los hidrolizados proteicos en la industria alimentaria, uno de ellos es como estabilizante de emulsiones [35]. Debido a su estructura molecular, los aminoácidos y también los péptidos y proteínas tienen carácter anfótero o anfílico. Esto es, presentan zonas hidrofílicas e hidrofóbicas diferenciadas dentro en la misma molécula, lo que hace que tiendan a situarse en la interfase aceite-agua y actúen como agente estabilizante de micelas lipídicas. En definitiva, el uso de estas proteínas hace que la tensión interfacial en el caso de emulsiones y que la tensión superficial en el caso de disoluciones disminuya, por lo que se obtienen emulsiones mucho más estables.

Los resultados obtenidos en la medida de la tensión superficial de los hidrolizados proteicos se recogen en la Figura 5. La disminución de la tensión superficial es notable para todos los hidrolizados, en comparación con la medida para el agua ultrapura a la misma temperatura (20 °C). El hidrolizado que provocó una reducción de la tensión superficial más drástica fue el obtenido a partir de la fracción soluble de la harina de pescado tratado con sCW, mientras que la tensión superficial más alta se observó en el hidrolizado de harina de pescado con Alcalase. El análisis estadístico (ANOVA) de los datos obtenidos para el agua ultrapura y los distintos hidrolizados arrojó un P-valor < 0,05, por lo que se determinó que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las tensiones superficiales medias de las distintas muestras, con un nivel de confianza del 95 %.

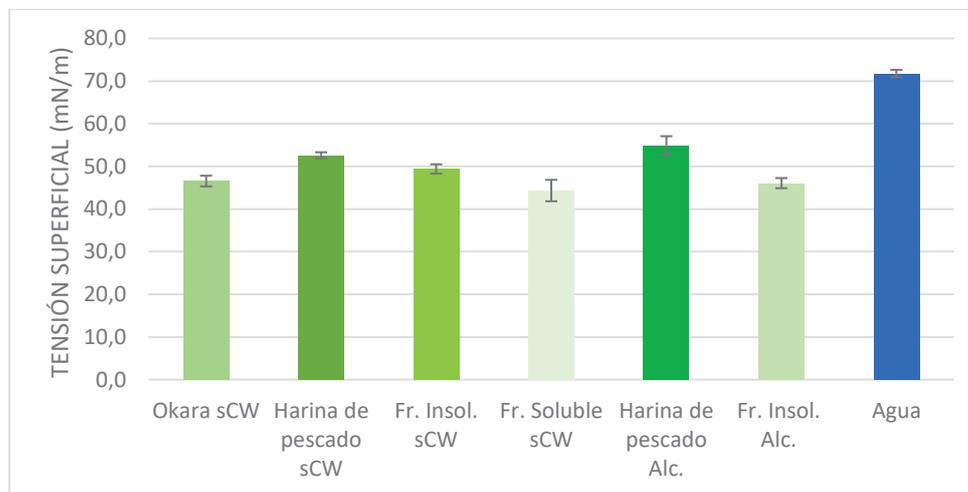


Figura 5: Comparativa de tensión superficial entre muestra diluidas al 2,1%.

La concentración de proteína utilizada tiene una relación significativa con la tensión superficial [36], ya que cuanto mayor sea la cantidad de proteína presente en la disolución mayor será la adsorción hasta alcanzar un valor constante, esto se define como la saturación de la interfase.

Por otro lado, como podemos observar que las muestras hidrolizadas por sCW obtienen una TS menor en comparación con su análogo hidrolizado enzimáticamente, lo que podría explicarse por el mayor grado de hidrólisis aunque también por este menor contenido de proteína de los hidrolizados obtenidos con Alcalase (ver Tabla 1).

4.3. Capacidad emulsionante y estabilidad de las emulsiones.

En primer lugar, para determinar la capacidad emulsionante de los hidrolizados de proteína, se realizó un seguimiento del tamaño de gota, expresado como $D[4,3]$, a lo largo de varios ciclos de tratamiento en el microfluidizador (Figura 6). Como se puede ver en la figura, la formación de una emulsión consta de dos fases: (1) la formación de gotas por ruptura de la fase dispersa y reformación de gotas más pequeñas, aumentando el área superficial específica de la emulsión, y (2) estabilización de las gotas formadas mediante adsorción de las nuevas gotas en la superficie recién creada con el fin de evitar recoalescencia. El rendimiento del proceso de emulsión dependerá del equilibrio entre ambas fases [37]. Para los hidrolizados de proteína estudiados, el tamaño de gota ($D[4,3]$) de la emulsión comienza a ser estable a partir de los ciclos 4-5 (Figura 6). Con el fin de asegurar un tamaño de partícula estable y al mismo tiempo evitar un sobre procesamiento de la muestra, se estableció el experimento en 7 ciclos de microfluidizador.

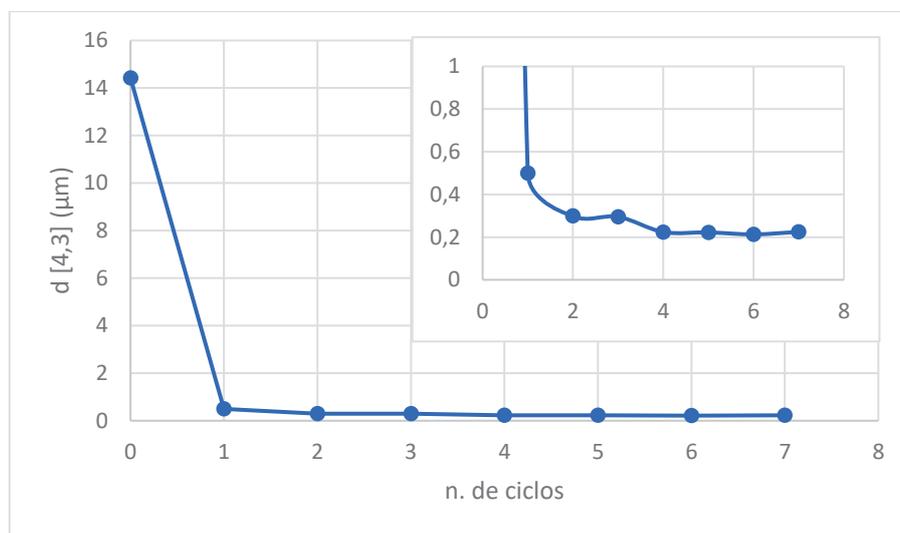


Figura 6: Evolución del tamaño de partícula de la emulsión por cada ciclo de microfluidizador.

4.3.1. Capacidad emulsionante.

Una vez determinado el número de ciclos adecuado para la producción de las emulsiones, se llevó a cabo el estudio de la distribución de tamaños de gota mediante difracción de rayo láser. Teniendo en cuenta que en algunas muestras las distribuciones de tamaño de gota son bi o trimodales, el parámetro $D[4,3]$ no describe completamente las características de las emulsiones ni su comportamiento durante del almacenamiento, por lo que se decidió utilizar la distribución de tamaños de partícula al completo.

Como podemos observar en la Figura 7, la harina de pescado y la fracción de proteína insoluble hidrolizadas con sCW permiten obtener emulsiones con tamaños de gota más pequeños, con una distribución entre 0,05 - 1,66 μm y centrada alrededor de 0,2 μm . Sin embargo, la emulsión obtenida con la fracción soluble hidrolizada mediante sCW también consigue tamaños de gota pequeños (<0,1 μm) pero con una distribución trimodal mucho más amplia, llegando a tamaños de gota de hasta 100 μm , mucho más inestables. En este caso, es posible que la mayor concentración de proteína y un mayor grado de hidrólisis (Tabla 1) afecten positivamente a la capacidad emulsionante.

Por su parte, las emulsiones con hidrolizados obtenidos a partir de Alcalase presentan tamaños de gota relativamente mayores, entre 0,631 μm y 34,67 μm . Cabe destacar que la emulsión obtenida a partir de la fracción soluble también presenta una distribución más

amplia, en este caso bimodal, que el resto de hidrolizados obtenidos con Alcalase, entre 0,9 y 40 μm .

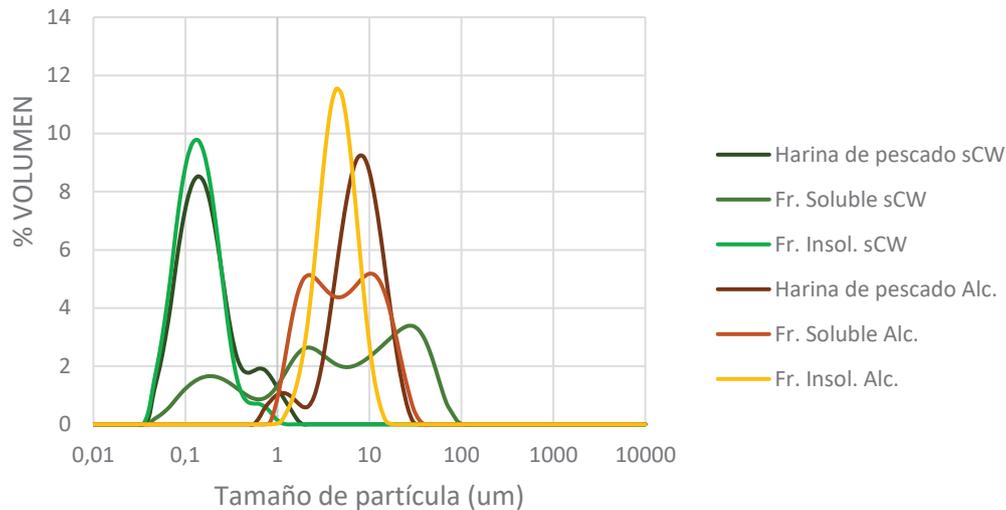


Figura 7: Comparación del tamaño de partícula de las emulsiones a día 0 según el método de hidrólisis.

En cuanto a la emulsión obtenida con el hidrolizado de okara mediante sCW, resultó en un tamaño de gota mucho mayor, comparado con el de las otras emulsiones obtenidas mediante sCW (Figura 8), si bien se obtuvo una distribución monomodal aunque más amplia.

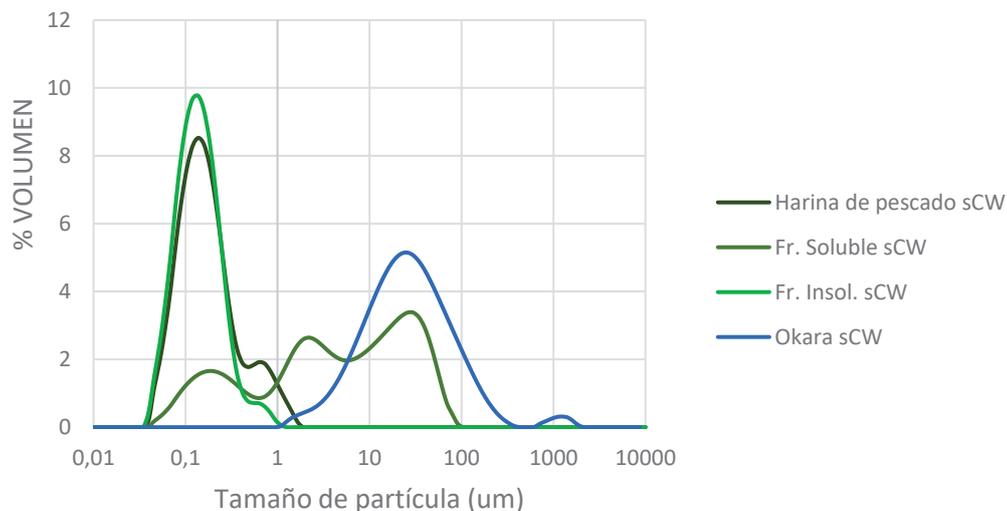


Figura 8: Comparación del tamaño de partícula de las emulsiones a día 0. Emulsiones formuladas con hidrolizados obtenidos mediante sCW.

4.3.2. Estabilidad de las emulsiones

Para determinar la estabilidad de emulsiones, estas se han mantenido en condiciones de oscuridad y refrigeración a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta 21 días. En este periodo de tiempo, se han realizado medidas de la distribución de tamaños de gota de forma periódica (Figura 9).

En el caso de las emulsiones obtenidas con hidrolizados de harina de pescado, observamos que el tratamiento sCW que conseguía tamaños de gota pequeños a día 0 se desestabiliza rápidamente puesto que las poblaciones de tamaños de partícula más grandes van aumentando conforme pasa el tiempo. También observamos la aparición de nuevos picos, llegando a una distribución trimodal que puede indicar fenómenos de coalescencia y

creaming. Por otro lado, con la hidrólisis enzimática se obtienen tamaños de partícula más grandes a día 0, pero mucho más estables pues las variaciones en la distribución de tamaños de gota son mínimas.

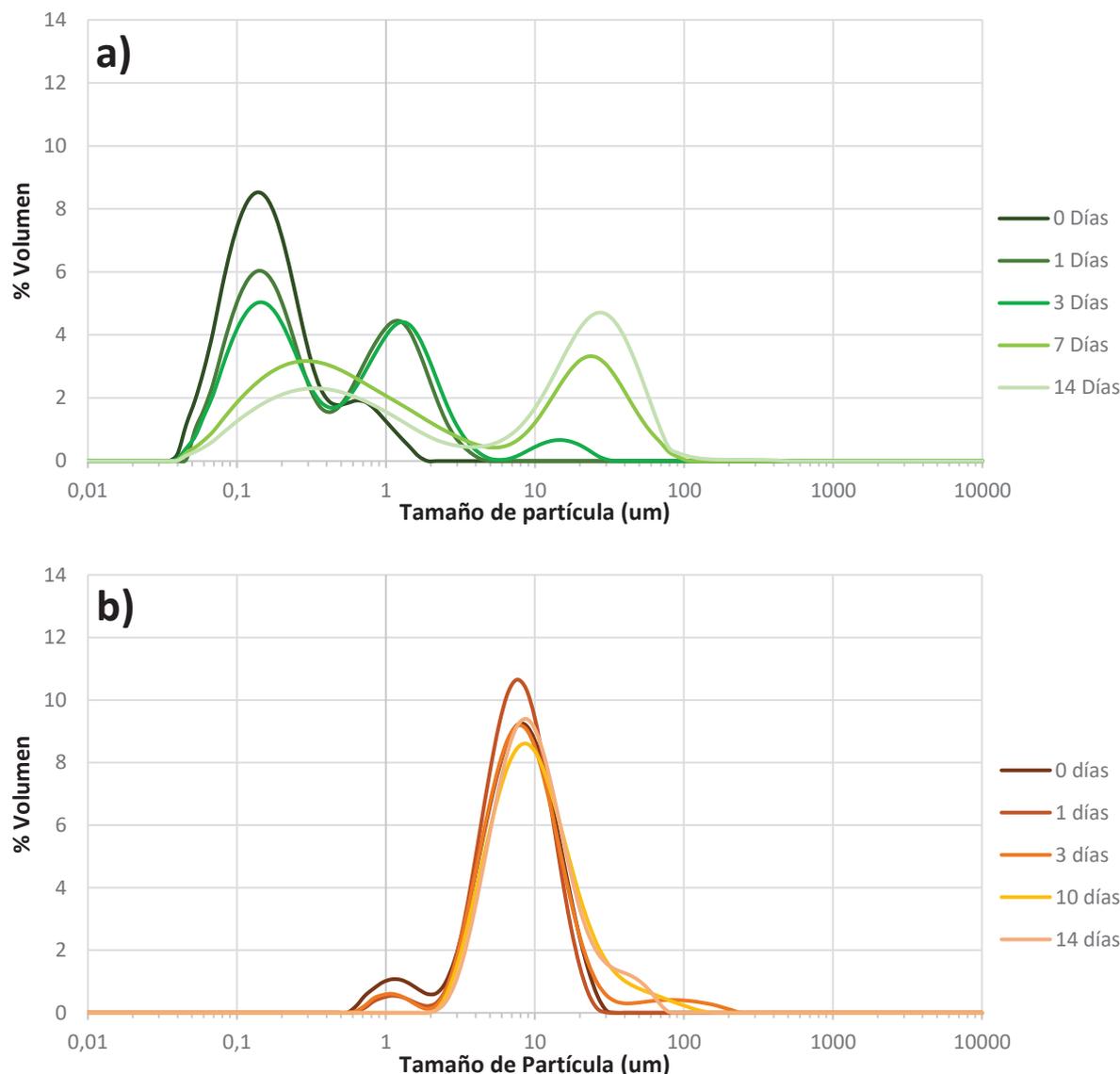


Figura 9: Evolución en el tiempo del tamaño de partícula de las emulsiones formuladas con hidrolizados de harina de pescado. (a): sCW; b): Alcalase).

En cuanto a las emulsiones obtenidas con los hidrolizados de la fracción soluble de la harina de pescado (Figura 10), observamos un comportamiento similar al anterior, si bien ambas emulsiones presentaban características más inestables desde el día 0. De nuevo, tras 14 días de almacenamiento, la emulsión obtenida a partir de hidrolizado sCW pierde las partículas más pequeñas y aumentan notablemente las poblaciones de mayor tamaño, mientras que la variación en Alcalase es menos importante.

En las emulsiones obtenidas con los hidrolizados de la fracción insoluble, la variación a lo largo de los 14 días de almacenamiento es mínima sin importar el tipo de tratamiento sCW o hidrólisis enzimática (Figura 11). Solo a partir del día 14 se observa una mayor variación en el caso de la emulsión obtenida con sCW, lo que puede ser un reflejo de la mayor inestabilidad observada en las emulsiones anteriores. Por otra parte, podemos ver que el tamaño de gota

obtenida con sCW es mucho menor que el obtenido con el hidrolizado de Alcalase, pudiendo considerarse una nano emulsión estable con una distribución centrada en los 100 nm.

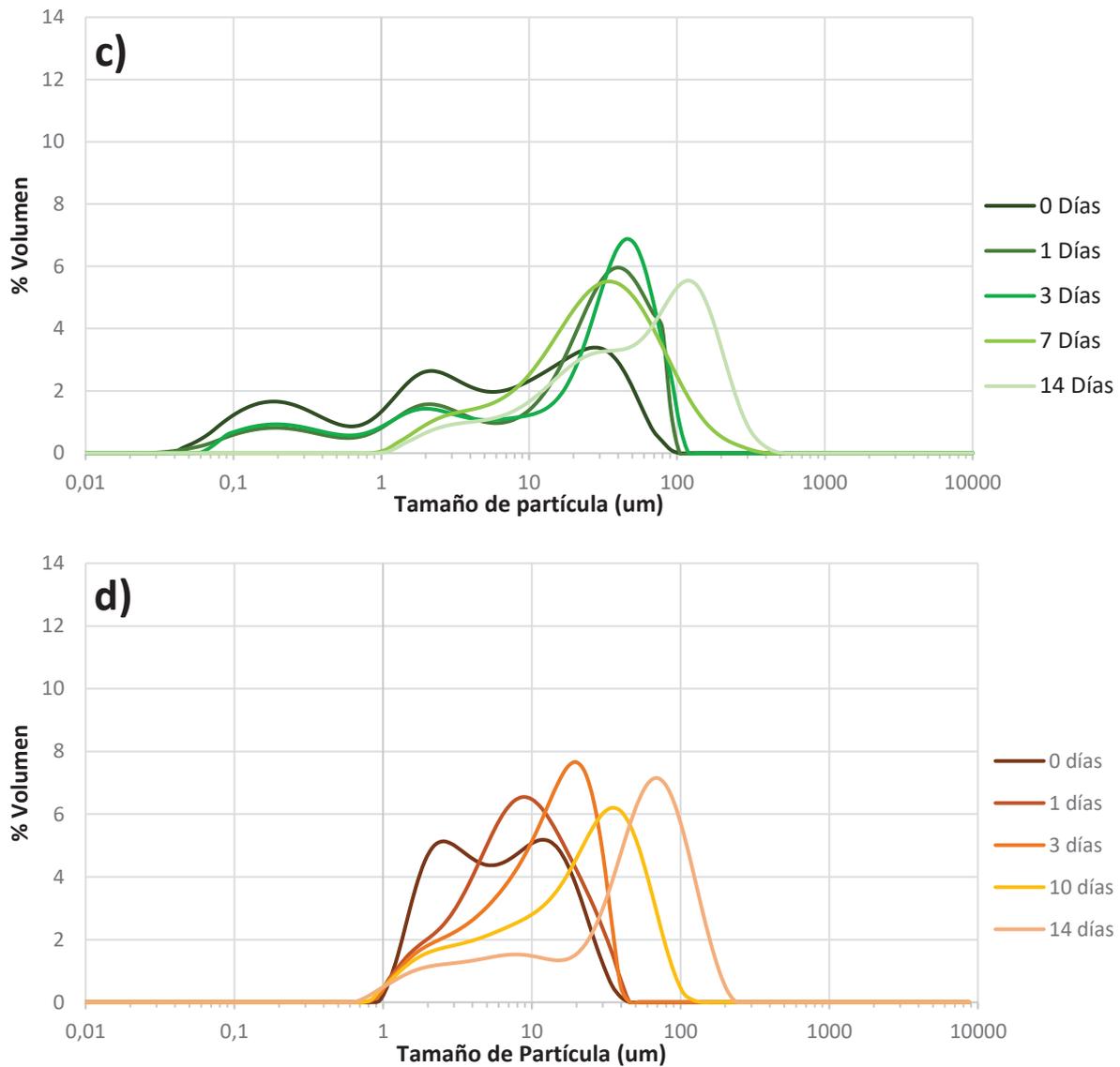


Figura 10: Evolución en el tiempo del tamaño de partícula de las emulsiones formuladas con hidrolizados de la fracción soluble de harina de pescado. (c): sCW; d): Alcalase).

Por último, la estabilidad de la emulsión con hidrolizado de okara mediante sCW se comportó de una forma peculiar, pues la distribución de tamaños de gota se fue estrechando con el tiempo y afilándose por el lado de las poblaciones de mayor tamaño 8 (Figura 12). Este comportamiento, a priori anómalo, puede explicarse por la baja capacidad emulsionante de este hidrolizado y un acusado fenómeno de coalescencia y *creaming*. Durante el almacenamiento, se observó la formación de gotas de grasa cada vez mayores en la parte superior de la emulsión. Estas gotas no se reintegraban a la emulsión con una ligera agitación, por lo que no están registradas en la distribución de tamaños de gota por ser imposibles de medir. Parece probable que estas macrogotas sean resultado de la coalescencia de las microgotas más grandes de la emulsión, lo que explicaría la aparente reducción de las poblaciones de mayor tamaño.

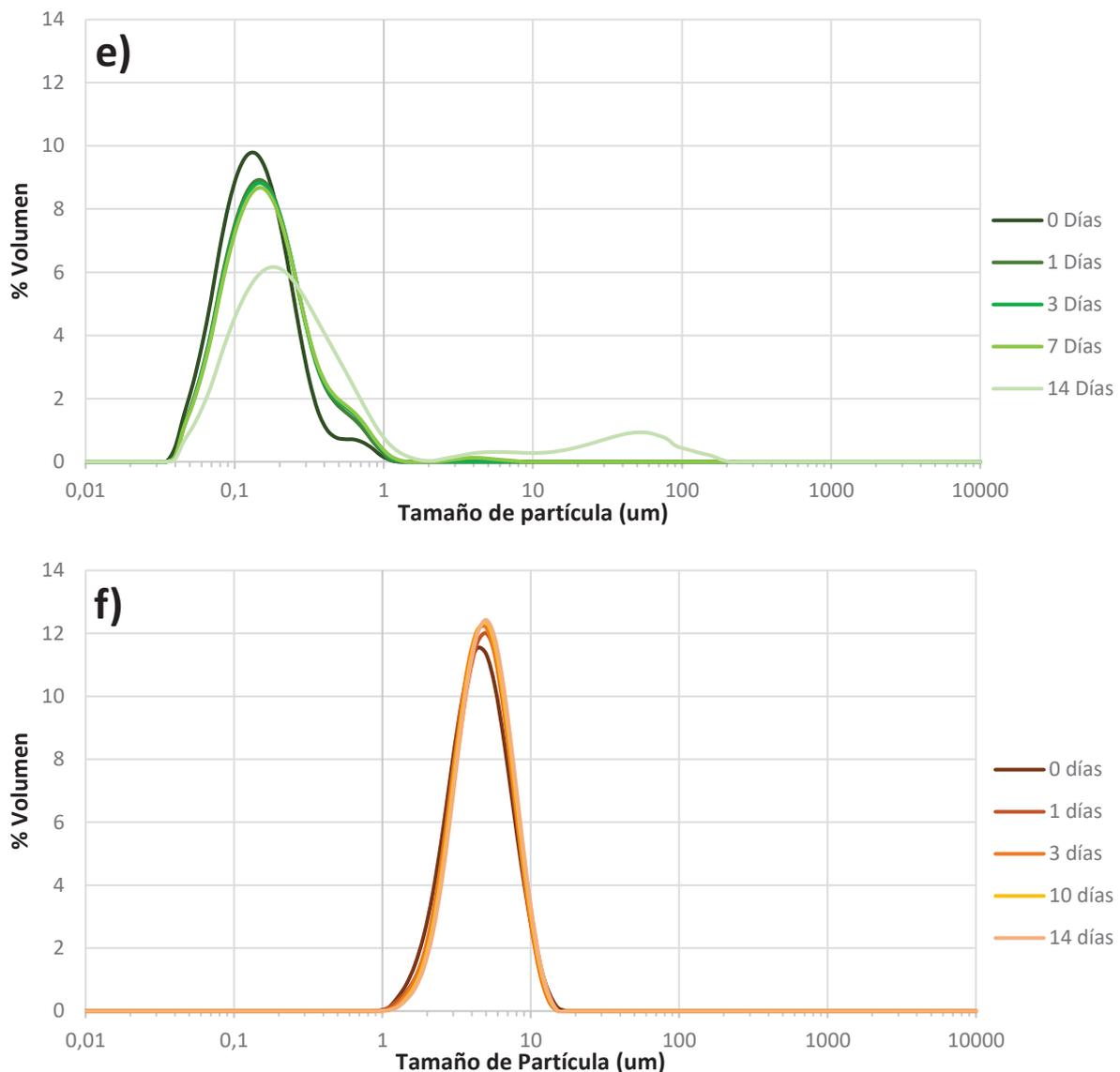


Figura 11: Evolución en el tiempo del tamaño de partícula de las emulsiones formuladas con hidrolizados de la fracción insoluble de harina de pescado. (e): sCW; f): Alcalase).

La baja capacidad emulsionante de los hidrolizados de okara y la inestabilidad de la emulsión obtenida pueden explicarse por el bajo contenido de proteína del hidrolizado, así como el bajo grado de hidrólisis detectado (Tabla 1).

Por otro lado, con el fin de determinar las cargas presentes en las distintas muestras emulsionadas, se procedió a realizar medidas de potencial Z durante 14 días, cuanto más alejado del 0 este el resultado del potencial Z mayor será la suma de cargas presentes en la emulsión, si los resultados tienden a 0 durante el almacenamiento, esto indica alteraciones en la composición interfacial de la emulsión [38]. Respecto a los resultados obtenidos, la emulsión que a día 0 obtuvo un mejor resultado fue la harina de pescado hidrolizada mediante sCW. Sin embargo durante el almacenamiento su evolución fue la más drástica, pasando de -38.82 ± 1.41 mV a -5.52 ± 3.15 mV. En contraposición, las muestras de proteína insoluble con Alcalasa y la okara con sCW obtuvieron los resultados más bajos a día 0 pero se mantuvieron estables a lo largo del periodo de almacenamiento (-18 ± 2.24 mV a -18.41 ± 4.03 y -18.41 ± 4.03 a -18.07 ± 1.53 , respectivamente).

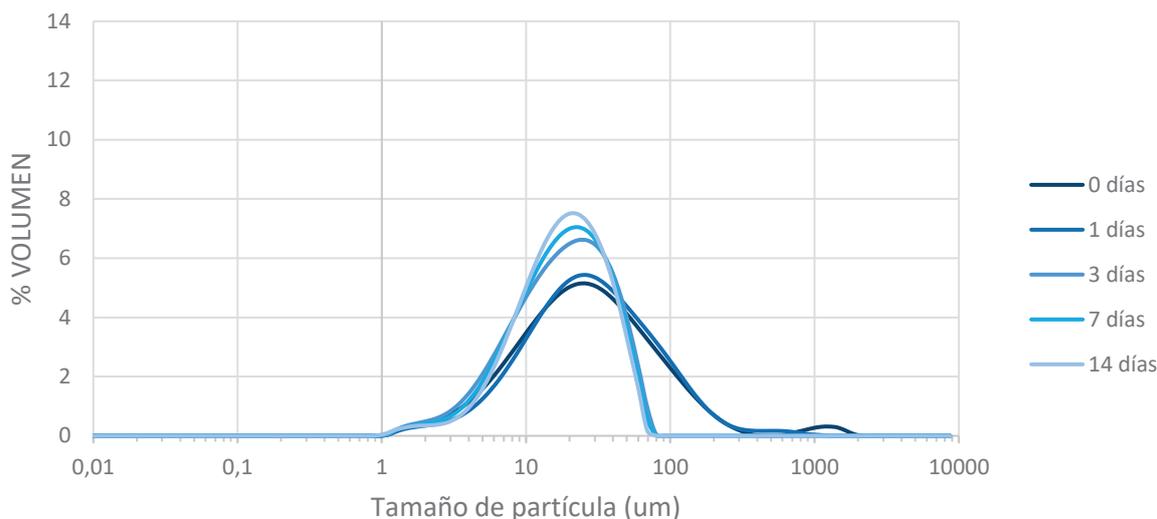


Figura 12: Evolución en el tiempo del tamaño de partícula de la emulsión formulada con hidrolizado de okara mediante sCW.

Según los estudios consultados, hay distintos puntos de vista sobre la relación que hay entre la capacidad emulsionante y los parámetros vistos anteriormente. Por un lado, Pan et al. [39] establecieron una correlación inversa entre la capacidad emulsionante de las proteínas y la solubilidad de estas. Así mismo, Liu et al. [40], determinaron que cuanto mayor sea el número de grupos hidrofóbicos expuestos se obtienen mejores propiedades emulsionantes, debido al aumento de la repulsión electrostática entre las gotas de la emulsión. Finalmente, Zang et al. [41], demostraron que cuanto mayor es el tamaño de las proteínas, aumenta la probabilidad de formación de agregado, por lo que la capacidad de adsorción sobre la superficie de las gotas de aceite disminuye y por tanto las propiedades emulsionantes.

Finalmente, con el fin de determinar si el aumento del tamaño de partícula de las emulsiones se debía a la floculación o a coalescencia, a día 7 se añadió dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10%, tal y como describen Santos et al [42]. En todos los casos, las poblaciones de partículas de mayor tamaño disminuyen al aplicar el defloculante a la emulsión. La disminución del parámetro D [4,3] se puede observar en la Tabla 2.

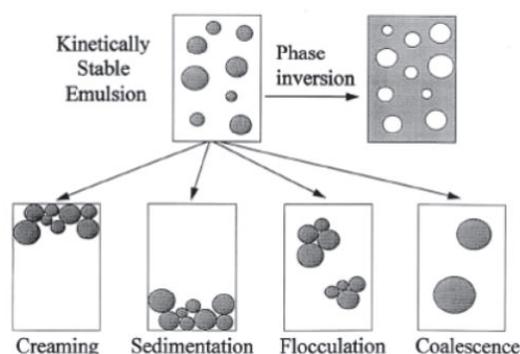


Figura 13: Mecanismos de desestabilización de emulsiones (Fuente: [43]).

Teniendo en cuenta los resultados, podemos determinar que el aumento del tamaño de partícula en las emulsiones se debe a la floculación (Figura 12), este fenómeno se debe a la

interacción entre las gotas de la emulsión. En las emulsiones alimentarias, las interacciones más comunes son las hidrofóbicas y electrostáticas. Por otro lado, la aplicación de SDS produce la ruptura de estas interacciones y como resultado, las gotas que estaban enlazadas se vuelven a separar y por tanto el tamaño de partícula disminuye. [37].

Tabla 2: Evolución del parámetro D[4,3] de las emulsiones estudiadas tras la aplicación de defloculante.

Muestra	D [4,3]	
	7 d	7 d + SDS
Hidrólisis sCW		
Harina de pescado	17,63 ± 2,77	4,22 ± 0,58
Fr. Soluble	54,28 ± 0,71	43,33 ± 0,49
Fr. Insoluble	12,90 ± 0,99	2,38 ± 0,61
Okara	33,81 ± 1,55	12,54 ± 3,44
Hidrólisis enzimática		
Harina de pescado	15,93 ± 1,72	10,09 ± 2,00
Fr. Soluble	n.d.	n.d.
Fr. Insoluble	4,96 ± 0,04	4,80 ± 0,02

4.4. Fluorescencia intrínseca e hidrofobicidad superficial.

4.4.1. Fluorescencia intrínseca.

La fluorescencia intrínseca de los hidrolizados de proteína estudiados en este trabajo se muestra en la Figura 14. Respecto a la muestra de okara, los resultados obtenidos no fueron concluyentes, dado que la muestra no emitió fluorescencia durante el experimento.

Como podemos observar, los espectros de emisión fluorescente son mayores en el caso de las muestras hidrolizadas mediante sCW, para una misma concentración de hidrolizado. Esto puede indicar una mayor concentración de proteína y también una mayor cercanía a la superficie de los residuos fluorescentes como el triptófano (TRP), normalmente enterrados en el interior de la proteína por su hidrofobicidad. Como ya se proponía en el estudio de la solubilidad, es posible que las altas temperaturas alcanzadas en sCW, además de conseguir fragmentos más pequeños, provoquen una mayor desnaturalización proteica y una mayor exposición de los grupos hidrofóbicos,

Por otra parte, las muestras de harina de pescado hidrolizadas por sCW, presentan su pico de máxima emisión hacia los 370 nm, mientras que las muestras hidrolizadas por Alcalase tienen su pico de máxima emisión sobre los 350 nm. Si bien ambos picos, en las condiciones de excitación y emisión estudiadas, corresponden con la respuesta del TRP [44] La variación de la posición de los máximos del espectro de emisión se conoce como desplazamiento de Stokes [45], y puede deberse a la exposición de los residuos fluorescentes al medio. Así, cuanto mayor sea la posición del máximo de emisión (red-shift), más expuestos están los residuos de triptófano (mayor es la modificación de las cargas de la superficie de la proteína) [46]. Según esto, se podría determinar que las muestras tratadas con sCW, que también son las que mayor grado de hidrólisis presentan (ver Tabla 1), son las que presentan una mayor cantidad de residuos de triptófano expuestos.

Por otra parte, en el caso de las muestras hidrolizadas con Alcalase observamos un pequeño segundo pico en el rango 300-320 nm. Este pequeño hombro podría coincidir con la tirosina (TYR), un aminoácido polar neutro que también presenta fluorescencia [44], lo que nos puede indicar que algunos residuos de esta se encuentran en la superficie de la proteína.

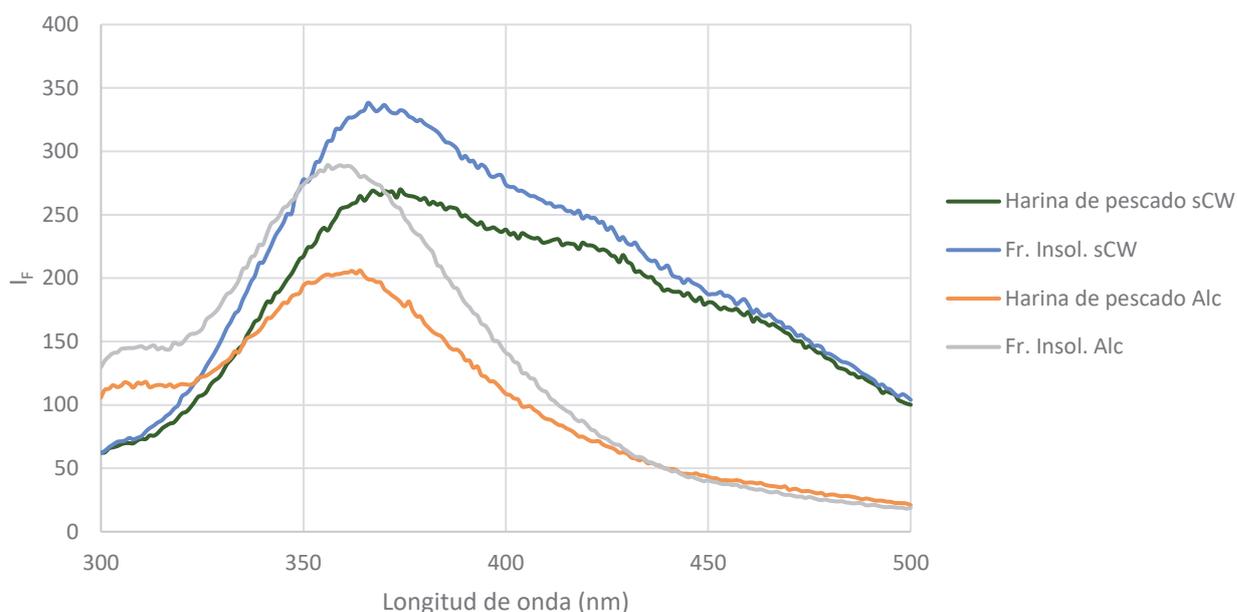


Figura 14: Fluorescencia intrínseca de los hidrolizados de harina de pescado (300-500nm)

4.4.2. Hidrofobicidad superficial

A partir del experimento de quenching de la fluorescencia de los hidrolizados de proteína podemos estimar la hidrofobicidad superficial de los mismos, ya que la fluorescencia del TRP, aminoácido hidrófobo, se verá más reducida bajo la presencia del quencher cuanto más cerca de la superficie se encuentre.

Para cada hidrolizado, se obtuvo la gráfica de Stern-Volmer (Figura 15), en la que se relaciona la extinción de la fluorescencia con la concentración de quencher (KI) en el medio.

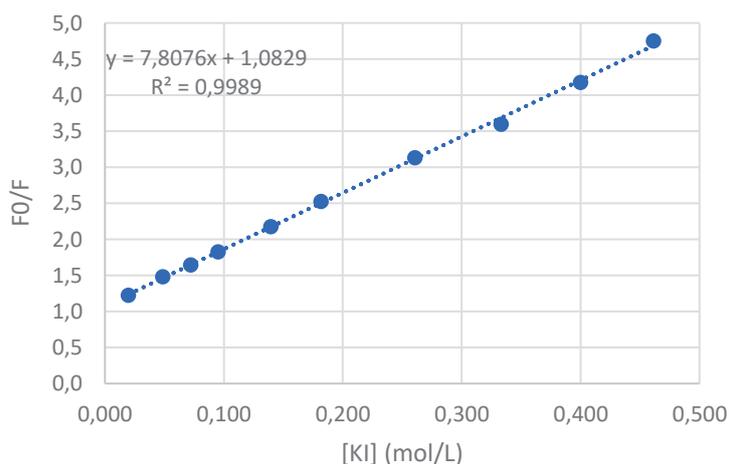


Figura 15: Gráfica de Stern-Volmer para la fracción insoluble de harina de pescado hidrolizada enzimáticamente.

La pendiente de esta recta es la constante de Stern-Volmer (K_{SV}), cuyo valor describe la accesibilidad que tiene el quencher (KI) al fluoróforo (TRP) [47]. De manera que cuanto más

expuestos estén los residuos de TRP, mayor será el valor de K_{SV} y la emisión fluorescente se verá más fuertemente afectada que si estuviera enterrada en la proteína [48].

Tabla 3: Valores de la constante de Stern-Volmer obtenidos para los hidrolizados estudiados en este trabajo.

Muestra	K_{SV}	Ord. Origen	R^2
Hidrólisis sCW			
Harina de pescado	12,138	1,367	0,9963
Fr. Soluble	9,841	1,237	0,9370
Fr. Insoluble	12,883	1,089	0,9970
Okara	n.d.	n.d.	n.d.
Hidrólisis enzimática			
Harina de pescado	8,255	1,046	0,9886
Fr. Soluble	2,711	1,170	0,9705
Fr. Insoluble	7,808	1,083	0,9986
Mezcla AAs	14,656	0,903	0,9978

Como podemos observar en la Tabla 3, los valores de K_{SV} más altos se han obtenido para las muestras hidrolizadas por sCW, lo que nos indica que la exposición de los residuos de TRP al medio es mayor que en el caso de las muestras tratadas con Alcalasa. Para comprobar si este comportamiento puede deberse a cambios conformacionales durante el tratamiento o a un mayor grado de hidrólisis, se realizó el mismo experimento de quenching con una mezcla sintética de aminoácidos, los cuales se mezclaron en las mismas proporciones y concentración que los hidrolizados de harina de pescado. En la Tabla X podemos observar que el valor de K_{SV} de la mezcla de aminoácidos es próxima a los obtenidos para los hidrolizados obtenidos por sCW, lo que confirma la hipótesis de que la mayor hidrofobicidad superficial es debida a un mayor grado de hidrólisis e incluso a la presencia de aminoácidos libres en las muestras tratadas por sCW.

5. Conclusiones

En el presente trabajo, se han explorado las propiedades tecnofuncionales de varios hidrolizados proteicos obtenidos mediante distintos métodos: agua subcrítica (sCW) e hidrólisis enzimática con la proteasa Alcalase. Entre las muestras analizadas, podemos encontrar hidrolizados de origen animal (harina de pescado) y vegetal (okara), así como distintas fracciones de estos (soluble e insoluble).

La caracterización de los extractos demostró un mayor grado de hidrólisis mediante sCW de harina de pescado y sus fracciones, mientras que el grado de hidrólisis en la okara fue menor. Para los subproductos estudiados, la hidrólisis con sCW es más efectiva que la hidrólisis enzimática con Alcalase. Este mayor grado de hidrólisis se ha corroborado mediante análisis HPLC-SEC, donde se observa que los hidrolizados obtenidos mediante sCW presentan péptidos de menor tamaño que las obtenidas con Alcalase.

Las muestras de harina de pescado hidrolizadas mediante sCW son las que mayor capacidad emulsionante presentan, sobre todo la fracción insoluble. Sin embargo, se observa una mayor estabilidad en las emulsiones formuladas con los hidrolizados obtenidos con Alcalase. Los hidrolizados de okara estudiados no tienen buenas propiedades emulsionantes. La estabilidad

de las emulsiones se puede relacionarse con los resultados de tensión superficial, pues los mayores valores de TS se obtuvieron para las muestras con menor estabilidad.

Por otro lado, y a pesar del mayor grado de hidrólisis, las muestras hidrolizadas por sCW son menos solubles que las obtenidas con Alcalase. Este comportamiento puede deberse a una mayor desnaturalización de la proteína y la exposición de grupos hidrofóbicos. Esta hipótesis pudo confirmarse con los experimentos de extinción de la fluorescencia, pues las muestras sCW fueron las que mayor hidrofobicidad superficial presentaron.

6. Bibliografía

- [1] FAO, F. (2012). The state of world fisheries and aquaculture. *Opportunities and challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations.*
- [2] D. H. Ngo, I. Wijesekara, T. S. Vo, Q. van Ta, and S. K. Kim, 'Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview', *Food Research International*, vol. 44, no. 2, pp. 523–529, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.FOODRES.2010.12.030.
- [3] F. Shahidi and Y. Zhong, 'Bioactive Peptides', *J AOAC Int*, vol. 91, no. 4, pp. 914–931, Jul. 2008, doi: 10.1093/JAOAC/91.4.914.
- [4] Ritchie, H., & Roser, M. (2020). Environmental impacts of food production. *Our world in data.*
- [5] K. S. Liu, 'Food Use of Whole Soybeans', *Soybeans: Chemistry, Production, Processing, and Utilization*, pp. 441–481, Jan. 2008, doi: 10.1016/B978-1-893997-64-6.50017-2.
- [6] Philip Davy & Quan V. Vuong (2020): Soy Milk By-product: Its Composition and Utilisation, *Food Reviews International*, DOI: 10.1080/87559129.2020.1855191
- [7] A. Jiménez-Escrig, M. Alaiz, J. Vioque, and P. Rupérez, 'Health-promoting activities of ultra-filtered okara protein hydrolysates released by in vitro gastrointestinal digestion: identification of active peptide from soybean lipoxygenase', *European Food Research and Technology*, vol. 230, no. 4, pp. 655–663, Feb. 2010, doi: 10.1007/s00217-009-1203-0.
- [8] J. Ge, C. X. Sun, M. Sun, Y. Zhang, and Y. Fang, 'Introducing panda bean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi et Ohashi) protein isolate as an alternative source of legume protein: Physicochemical, functional and nutritional characteristics', *Food Chem*, vol. 388, 133016, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.foodchem.2022.133016.
- [9] M. Ma *et al.*, 'Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal', *Food Chem*, vol. 240, pp. 856–862, Feb. 2018, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.030.
- [10] M. C. Puppo, F. Speroni, N. Chapleau, M. de Lamballerie, M. C. Añón, and M. Anton, 'Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins', *Food Hydrocoll*, vol. 19, no. 2, pp. 289–296, Mar. 2005, doi: 10.1016/j.foodhyd.2004.07.001.
- [11] P. J. Vioque, A. Clemente, J. Pedroche, M. del Mar Yust, and F. Millán, 'Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos' *Instituto de la grasa, grasas y aceites*, vol. 52, pp. 132–136, 2001.

- [12] L. Ramos, E. M. Kristenson, and U. A. T. Brinkman, 'Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis', *J Chromatogr A*, vol. 975, no. 1, pp. 3–29, Oct. 2002, doi: 10.1016/S0021-9673(02)01336-5.
- [13] P. Barea, R. Melgosa, A.E. Illera, P. Alonso-Riaño, E. Díaz de Cerio, O. Benito-Román, S. Beltrán, M. T. Sanz, 'Production of small peptides and low molecular weight amino acids by subcritical water hydrolysis from fish meal: effect of pressurization agent and comparison with enzymatic hydrolysis, Food Chemistry (under review)'.
- [14] Laura Serna Infante, 'Separación mediante pervaporación de compuestos de degradación producidos en la hidrólisis mediante agua subcrítica del bagazo de cerveza', 2021. Trabajo Fin de grado Universidad de Burgos.
- [15] 'Microanálisis Elemental (CHNS)', <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/analisis-elemental/microanalisis-elemental-chns>.
- [16] M. Friedman, 'Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences', *J Agric Food Chem*, vol. 52, no. 3, pp. 385–406, Feb. 2004, doi: 10.1021/JF030490P.
- [17] E. Trigueros, P. Alonso-Riaño, C. Ramos, C. I. K. Diop, S. Beltrán, and M. T. Sanz, 'Kinetic study of the semi-continuous extraction/hydrolysis of the protein and polysaccharide fraction of the industrial solid residue from red macroalgae by subcritical water', *J Environ Chem Eng*, vol. 9, no. 6, p. 106768, Dec. 2021, doi: 10.1016/J.JECE.2021.106768.
- [18] J. S. Hamada And W. E. Marshall, 'Preparation and Functional Properties of Enzymatically Deamidated Soy Proteins', *J Food Sci*, vol. 54, no. 3, pp. 598–601, 1989, doi: 10.1111/J.1365-2621.1989.TB04661.X.
- [19] Zhang, Q. T., Tu, Z. C., Wang, H., Huang, X. Q., Fan, L. L., Bao, Z. Y., & Xiao, H. (2015). Functional properties and structure changes of soybean protein isolate after subcritical water treatment. *Journal of food science and technology*, 52, 3412-3421. doi: 10.1007/S13197-014-1392-9.
- [20] Roca, P., Oliver, J., & Rodríguez, A. M. (2004). *Bioquímica: técnicas y métodos*. Editorial Hélice.
- [21] G. Zhao, Y. Liu, M. Zhao, J. Ren, and B. Yang, 'Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate', *Food Chem*, vol. 127, no. 4, pp. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 1438–1443, Aug. 2011, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2011.01.046.
- [22] Illera, A. E., Beltrán, S., & Sanz, M. T. (2019). Structural changes of a protein extract from apple with polyphenoloxidase activity obtained by cationic reversed micellar extraction induced by high-pressure carbon dioxide and thermosonication. *Scientific Reports*, 9(1), 13749, doi: 10.1038/s41598-019-50209-w.
- [23] Delahaije, R. J., Sagis, L. M., & Yang, J. (2022). Impact of particle sedimentation in pendant drop tensiometry. *Langmuir*, 38(33), pp. 10183-10191., Aug. 2022, doi: 10.1021/ACS.LANGMUIR.2C01193/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA2C01193_M004.GIF.

- [24] 'Equipo de medida de Distribución de Tamaños de Partícula MASTERSIZER-2000, Malvern'. <https://www.uam.es/uam/sidi/equipamiento-txrf-mastersizer2000> (accessed Jan. 17, 2023).
- [25] S. Samimi, N. Maghsoudnia, R. B. Eftekhari, and F. Dorkoosh, 'Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems 3', 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-814031-4.00003-9.
- [26] L. Yang, Y. Xing, R. Chen, H. Ni, and H. H. Li, 'Isolation and identification of antioxidative peptides from crocodile meat hydrolysates using silica gel chromatography', *Scientific Reports* 2022 12:1, vol. 12, no. 1, pp. 1–10, Aug. 2022, doi: 10.1038/S41598-022-16009-5.
- [27] H. M. Poggi-Varaldo, M. Eugenia Bátiz Solórzano, J. Alfredo Pineda-Cruz, S. Caffarel-Méndez, and A. Totosaus, 'Cuaderno de tecnología n° 2 funcionalidad de proteínas musculares', 2006.
- [28] Wouters, A. G., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 786-800., doi: 10.1111/1541-4337.12209.
- [29] L. Were, N. S. Hettiarachchy, and U. Kalapathy, 'Modified Soy Proteins with Improved Foaming and Water Hydration Properties', *J Food Sci*, vol. 62, no. 4, p. 821, 1997, doi: 10.1111/j.1365-2621.1997.tb15463.x.
- [30] Montalvo, C., López-Malo, A., & Palou, E. (2012). Películas comestibles de proteína: características, propiedades y aplicaciones. *Temas Sel. Ing. Aliment*, 6, 32-46.
- [31] Voet D. and Voet J., *Bioquímica*, 3ª edición. Editorial Médica Panamericana, 2006.
- [32] Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Emulsifying and foaming properties of okara protein hydrolysates. *Cereal Chemistry*, 93(1), 71-76., doi: 10.1094/CCHEM-02-15-0031-R.
- [33] D. Das, N. A. Mir, N. K. Chandla, and S. Singh, 'Combined effect of pH treatment and the extraction pH on the physicochemical, functional and rheological characteristics of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed protein isolates', *Food Chem*, vol. 353, p. 129466, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2021.129466.
- [34] D. N. López, V. Boeris, D. Spelzini, C. Bonifacino, L. A. Panizzolo, and C. Abirached, 'Adsorption of chia proteins at interfaces: Kinetics of foam and emulsion formation and destabilization', *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 180, pp. 503–507, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2019.04.067.
- [35] Yashini, M., Sunil, C. K., Sahana, S., Hemanth, S. D., Chidanand, D. V., & Rawson, A. (2021). Protein-based fat replacers—a review of recent advances, *Food Reviews International*, vol. 37, no. 2. Bellwether Publishing, Ltd., pp. 197–223, 2021. doi: 10.1080/87559129.2019.1701007.
- [36] R. Miller, E. v. Aksenenko, V. B. Fainerman, and U. Pison, 'Kinetics of adsorption of globular proteins at liquid/fluid interfaces', *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 183–185, pp. 381–390, Jul. 2001, doi: 10.1016/S0927-7757(01)00523-4.
- [37] Benito-Román, T. Sanz, and S. Beltrán, 'Microencapsulation of rice bran oil using pea protein and maltodextrin mixtures as wall material', *Heliyon*, vol. 6, no. 4, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.HELİYON.2020.E03615.

- [38] C. E. Gumus, E. A. Decker, and D. J. McClements, 'Impact of legume protein type and location on lipid oxidation in fish oil-in-water emulsions: Lentil, pea, and faba bean proteins', 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.029.
- [39] N. Pan *et al.*, 'Mechanisms of Change in Emulsifying Capacity Induced by Protein Denaturation and Aggregation in Quick-Frozen Pork Patties with Different Fat Levels and Freeze-Thaw Cycles', *Foods* 2022, Vol. 11, Page 44, vol. 11, no. 1, p. 44, Dec. 2021, doi: 10.3390/FOODS11010044.
- [40] Q. Liu, Y. Lu, J. Han, Q. Chen, and B. Kong, 'Structure-modification by moderate oxidation in hydroxyl radical-generating systems promote the emulsifying properties of soy protein isolate', *Food Structure*, vol. 6, pp. 21–28, Oct. 2015, doi: 10.1016/J.FOOSTR.2015.10.001.
- [41] C. Zhang, H. Liu, X. Xia, F. Sun, and B. Kong, 'Effect of ultrasound-assisted immersion thawing on emulsifying and gelling properties of chicken myofibrillar protein', *LWT*, vol. 142, May 2021, doi: 10.1016/J.LWT.2021.111016.
- [42] Santos, J., Calero, N., Muñoz, J., & Cidade, M. T. (2018). Development of food emulsions containing an advanced performance xanthan gum by microfluidization technique. *Food Science and Technology International*, 24(5), 373-381.
- [43] D. P. Clements, *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, 2nd edition. 1999.
- [44] J. R. Albani, 'New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence : Origin of the fluorescence lifetime and characterization of a new fluorescence parameter in proteins: The emission to excitation ratio', *J Fluoresc*, vol. 17, no. 4, pp. 406–417, Jul. 2007, doi: 10.1007/s10895-007-0183-3.
- [45] C. A. Briones-Vázquez and A. Álvarez-Hernández, 'Sondas fluorescentes, una revisión general: propiedades, diseño y aplicaciones', *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, vol. 9, no. 17, pp. 9–16, Jul. 2021, doi: 10.29057/ICBI.V9I17.7143.
- [46] D. N. López *et al.*, "Structural characterization of protein isolates obtained from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds", *LWT*, vol. 90, pp. 396–402, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.LWT.2017.12.060.
- [47] Benito-Román, M. T. Sanz, A. E. Illera, R. Melgosa, J. M. Benito, and S. Beltrán, 'Pectin methylesterase inactivation by High Pressure Carbon Dioxide (HPCD)', *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 145, pp. 111–121, Mar. 2019, doi: 10.1016/j.supflu.2018.11.009.
- [48] M. Möller and A. Denicola, 'Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching', *Biochemistry and Molecular Biology Education*, vol. 30, no. 3, pp. 175–178, Jul. 2002, doi: 10.1002/BMB.2002.494030030035.

Agradecimientos

Este Trabajo Fin de Grado ha sido realizado en el marco de los siguientes proyectos de investigación del grupo Biotecnología Industrial y Medioambiental (BIOIND) de la Universidad de Burgos:

PID2019-104950RB-I00 - Valorización de subproductos marinos mediante tecnologías de fluidos sub- y supercríticos para la obtención de biocompuestos valiosos, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

BU050P20 - Valorización de la fracción proteica de subproductos de la industria agroalimentaria de Castilla y León mediante tecnologías de fluidos presurizados, financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

PID2020-116716RJ-I00 - Tecnologías de fluidos presurizados para la valorización de subproductos de la industria agroalimentaria: recuperación de pectina y otros compuestos bioactivos de alto valor, financiado por la Agencia Estatal de Investigación.

TED2021-129311B-I00 - Tecnologías verdes basadas en el empleo de fluidos presurizados para valorizar biomasa lignocelulósica mediante la producción de furfural, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

PDC2022-133443-I00 - Diseño de un prototipo para la extracción de bioproductos con agua subcrítica, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación