

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

**VALORIZACIÓN DE SANGRE DE
MATADEROS MEDIANTE EL DESARROLLO
DE NUEVOS MATERIALES Y PRODUCTOS**

**TESIS DOCTORAL
POR**

M^a del Pilar del Hoyo González

2012

AGRADECIMIENTOS

A Mario Díaz, por haberme dado la oportunidad de trabajar en su equipo, así como por sus sugerencias, sin las cuáles no hubiese sido posible la elaboración de este trabajo.

A Manuel Rendueles, por su inagotable colaboración y por su apoyo constante. Un millón de gracias (y aun así es poco) por guiarme en la realización de esta tesis, por ayudarme en todo momento y por animarme cuando más lo necesitaba.

A Benjamín Paredes, por compartir conmigo su “sabiduría reológica” y por brindarme su ayuda siempre que la he necesitado.

A mis compañeros de fatigas, Bea, Emily, Noi, Rober, Silvi y Pepe. Gracias por haberme hecho la vida más feliz durante todo este tiempo. Gracias por estar ahí en los buenos momentos y en los no tan buenos. Gracias por apoyarme siempre y por regalarme vuestra amistad. Vosotros también tenéis la mía para siempre.

Al resto de mis compañeros, maestros del trabajo bien hecho, por saber mantener día a día el laboratorio y la sala como un lugar alegre, distendido y de camaradería y porque de alguna manera me han ayudado en el desarrollo de mi trabajo.

A Nuri y a Paulina, por que siempre me han brindado su cariño y su amistad.

A Juanjo, por estar siempre ahí y por saber arrancarme una sonrisa cada día.

Y, sobre todo, a mis padres, a mi hermano y a Puri, por su apoyo incondicional, por su cariño y por saber escucharme y alentarme en todo momento.

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	5
1. CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	6
1.1. RESIDUOS ALIMENTARIOS CON CONTENIDO PROTEICO.....	6
1.1.1. Sangre animal.....	6
1.1.1.1. Composición.....	6
1.1.1.2. Características físicas.....	7
1.1.1.3. Fracciones: plasma/suero y elementos formes.....	8
a. Plasma/ suero.....	8
b. Elementos formes.....	13
1.1.2. Lisozima de clara de huevo.....	13
1.2. PROCESOS DE DESMINERALIZACIÓN.....	14
1.2.1. Desmineralización por intercambio iónico.....	15
1.2.1.1. Intercambio iónico en columna.....	15
a. Empaquetamiento de la columna.....	16
b. Acondicionamiento del intercambiador.....	16
c. Etapa de carga.....	16
d. Etapa de regeneración.....	17
1.2.2. Desmineralización por técnicas de membranas.....	17
1.2.2.1. Ultrafiltración.....	20
1.3. DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN DE LAS	

PROTEÍNAS.....	21
1.3.1. Proceso de desnaturalización.....	21
1.3.2. Proceso de renaturalización.....	23
1.4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS Y SU APLICACIÓN TECNOLÓGICA.....	24
1.4.1. Propiedades de hidratación.....	25
1.4.2. Solubilidad.....	26
1.4.3. Propiedades emulsificantes.....	27
1.4.4. Propiedades espumantes.....	28
1.4.5. Tensión superficial.....	29
1.4.6. Aprovechamiento de las propiedades funcionales.....	31
1.5. SÍNTESIS DE MATERIALES. GELES PROTEICOS SANGUÍNEOS.....	33
1.5.1. Las redes poliméricas.....	33
1.5.2. Las dispersiones agregadas.....	33
1.6. LA REOLOGÍA.....	34
1.6.1. Los fluidos alimentarios según su comportamiento reológico.....	35
1.6.1.1. Fluidos newtonianos.....	35
1.6.1.2. Fluidos no newtonianos.....	35
a. Fluidos con comportamiento reológico independiente del tiempo.....	36
a.1. Fluidos pseudoplásticos.....	36
a.2. Fluidos dilatantes.....	36
a.3. Fluidos plásticos.....	36
b. Fluidos con comportamiento reológico dependiente del tiempo.....	36

b.1. Fluidos tixotrópicos.....	37
b.2. Fluidos reopécticos.....	37
c. Fluidos viscoelásticos.....	37
1.6.2. Modelización del comportamiento reológico de los alimentos.....	39
2. CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
2.1. PROCESADO DE RESIDUOS CON CONTENIDO PROTEICO.....	41
2.1.1. Procesado de la sangre.....	41
2.1.1.1. Obtención de la sangre.....	41
2.1.1.2. Métodos de separación de la sangre.....	42
a. Fraccionamiento de la sangre.....	42
b. Fraccionamiento del plasma.....	42
c. Separación de las proteínas celulares.....	44
c.1. Hemólisis celular.....	44
c.2.Precipitación y decoloración del contenido proteico.....	44
2.2. PROCESOS DE DESMINERALIZACIÓN DEL PLASMA.....	46
2.2.1. Desmineralización por intercambio iónico.....	46
2.2.1.1. Intercambio catiónico.....	46
2.2.1.2. Intercambio aniónico.....	48
2.2.2. Desmineralización por ultrafiltración.....	49
2.3. DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN.....	52
2.3.1. Análisis de la desnaturalización sufrida por las proteínas del plasma sanguíneo.....	52
2.3.2. Renaturalización de lisozima.....	52

2.4. PROPIEDADES FUNCIONALES.....	53
2.4.1. Determinación de la solubilidad.....	53
2.4.2. Determinación de las propiedades emulsificantes.....	53
2.4.3. Determinación de las propiedades espumantes.....	54
2.4.4. Determinación de la tensión superficial.....	54
2.5. SÍNTESIS DE LOS GELES DE PROTEÍNAS SANGUÍNEAS.....	56
2.5.1.1. Redes poliméricas.....	56
2.5.1.2. Dispersiones agregadas	56
2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN	57
2.6.1. Fracciones sanguíneas.....	57
2.6.1.1. Método de Lowry.....	57
2.6.2. Determinación de cationes.....	58
2.6.2.1. Determinación de aniones.....	58
2.6.2.2. Medida del pH.....	59
2.6.2.3. Medida de la humedad.....	59
2.6.2.4. Electroforesis.....	60
2.6.3. Geles proteicos sanguíneos.....	60
2.6.3.1. Determinaciones reológicas.....	60
2.6.3.2. Análisis térmico diferencial.....	63
2.6.3.3. Análisis de la distribución granulométrica.....	63
2.6.3.4. Análisis de la microestructura (SEM).....	64
2.6.3.5. Determinación de la capacidad de retención de agua.....	64
2.6.3.6. Liofilización.....	65

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
3. CAPÍTULO 3: DESMINERALIZACIÓN DE PLASMA.....	66
3.1. Demineralization by ion exchange of slaughterhouse porcine blood plasma.....	67
3.2. Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration.....	83
4. CAPÍTULO 4: PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DESMINERALIZADAS.....	92
4.1. Determinación por viscosimetría de la desnaturalización de proteínas sometidas a operaciones de desmineralización.....	93
4.2. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma.....	108
4.3. Desnaturalización y renaturalización de proteínas procedentes de residuos alimenticios.....	115
5. CAPÍTULO 5: SÍNTESIS DE MATERIALES A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN CELULAR.....	126
5.1. Rheological characterization of heat induced gels of porcine haemoglobin.....	127
5.2. Decolorized porcine globin gels produced by heat-induced gelation. Physical and rheological characterization.....	146

6. CAPÍTULO 6: SÍNTESIS DE MATERIALES A PARTIR DE LAS	
PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN PLASMÁTICA.....	168
6.1. Geles sintetizados a partir del plasma.....	168
6.1.1. Rheological characterization and thermal behavior of porcine blood plasma protein gels.....	169
6.1.2. Caracterización reológica de los geles de plasma sintetizados con glicerol.....	188
6.2. Geles sintetizados a partir de las fracciones del plasma.....	200
6.2.1. Caracterización reológica de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas de plasma porcino.....	201
6.2.2. Rheological characterization of thermal gels of α and β -globulins from porcine blood plasma	225
6.2.3. Rheological characterization of thermal gels of porcine blood plasma albumins.....	246
CONCLUSIONES.....	265
APÉNDICES.....	268
I. Lista de Figuras.....	268
II. Listas de Tablas.....	275
III. Nomenclatura.....	282
IV. Bibliografía global.....	288
V. Difusión de la tesis.....	296

RESUMEN

Existen ciertos residuos procedentes de la industria alimentaria susceptibles de ser recuperados y revalorizados. Tal es el caso de algunos subproductos que presentan un alto contenido en proteínas, ya que estas pueden ser aprovechadas dado su alto poder nutricional. La sangre procedente de los mataderos constituye uno de los residuos más problemáticos dada su abundancia y su alto poder contaminante. Sin embargo, también se trata de un producto con un alto contenido proteico, pudiendo ser incorporado como ingrediente a multitud de productos alimentarios. Las dos fracciones de la sangre (celular y plasmática) han sido tratadas para obtener una óptima separación de sus proteínas. Inicialmente se llevó a cabo el aislamiento del contenido proteico del plasma, para lo que ha sido necesario realizar un proceso de desmineralización. Dos técnicas de desmineralización, el intercambio iónico y la ultrafiltración, se han comparado desde un punto de vista técnico estableciendo las ventajas e inconvenientes a tener en cuenta en función de la escala de trabajo.

Se ha determinado, asimismo, el grado de desnaturalización que sufrieron las proteínas sometidas a dichos tratamientos. Las dos técnicas de desmineralización utilizadas produjeron cambios en la conformación de las proteínas, resultando algo superior el efecto producido por el proceso de intercambio iónico. En este contexto se han ensayado técnicas de caracterización del proceso de renaturalización (refolding), obteniéndose buenos resultados. También se ha valorado la influencia de ambos tratamientos en las propiedades funcionales de las proteínas. Los cambios provocados pueden determinar la idoneidad de una proteína para ser utilizada como aditivo en un producto alimentario. Los resultados obtenidos indican que todas las proteínas presentaron buenas propiedades funcionales, incluso se ha vislumbrado que la utilización de las técnicas de intercambio iónico y ultrafiltración puede mejorar la capacidad emulsificante de las proteínas. El plasma sin tratar, gracias a su excelente solubilidad y capacidad espumante, podría añadirse a productos lácteos, bebidas y pan. El plasma descationizado podría ser adicionado a pasteles, productos cárnicos, soufflés y pan.

Finalmente, se ha considerado la posibilidad de aprovechar las excelentes propiedades gelificantes de las diferentes fracciones de la sangre para preparar geles con

RESUMEN

multitud de usos potenciales. Estos geles sanguíneos se han elaborado bajo diferentes condiciones (pH, liofilización) lo que ha permitido establecer comparaciones a tener en consideración en función de sus aplicaciones posteriores. Se han preparado geles de ambas fracciones sanguíneas aplicando un tratamiento térmico y se ha realizado, en todos los casos, una caracterización de los mismos mediante determinaciones reológicas, DSC, microscopía electrónica de barrido, etc. La hemoglobina, que es la principal proteína de la fracción celular, produjo geles muy resistentes y viscoelásticos. La globina decolorada, obtenida a partir de la hemoglobina, también originó geles con muy buenas propiedades que, además, presentaron la ventaja de resultar organolépticamente mucho más deseables para los consumidores. En cuanto a la fracción plasmática, se han obtenido geles de plasma y de algunas de las fracciones plasmáticas, presentado todos ellos una gran resistencia y elasticidad. En el caso de los geles de plasma, además de los sintetizados por tratamientos térmicos también se han preparado geles mediante la adición de sustancias gelificantes (glicerol), obteniéndose en este último caso productos altamente viscosos. En general, estos nuevos materiales sintetizados a partir de proteínas sanguíneas podrían ser usados como espesantes o como películas para proteger los alimentos.

ABSTRACT

Many wastes from the food industry can be recovered and revalued. Such is the case of some remnants with high protein content, which proteins can be used for their high nutritional value. Blood from slaughterhouses is one of the most problematic by-products due to its abundance and high polluting charge. However, it is also a product with high protein content that can be incorporated as an ingredient to many food products. The two fractions of blood (plasma and cells) have been treated for getting an optimal separation of their proteins. An isolation of plasma protein content is firstly required, for which it has been necessary to undertake a demineralization process. Two techniques of demineralization, ion exchange and ultrafiltration, have been compared from a technical point of view, setting out the advantages and disadvantages to consider depending on the scale of work.

The degree of protein denaturation suffering under these treatments has also been determined. Both techniques, ion exchange and ultrafiltration, caused changes in the conformation of proteins, resulting slightly higher the effect produced by the ion exchange process. In this context, a process of renaturation (refolding) has been proved, obtaining good results. In addition, the influence of both treatments on the functional properties of proteins has been evaluated. Induced conformational changes can determine the suitability of a protein to be used as an additive in a food product. Results show that all proteins presented good functional properties. The use of ion exchange and ultrafiltration may even improve the emulsifying capacity of proteins. Untreated plasma, thanks to its excellent solubility and foaming capacity could be added to dairy products, drinks and bread. Decationed plasma could be added to cakes, meat products, soufflés and breads.

Finally, the possibility to profit the excellent gelling properties of different blood fractions to prepare gels with many potential uses has been considered. These blood gels have been developed under different conditions (pH, lyophilization), allowing us to establish comparisons to be taken into account in terms of their subsequent applications. Gels were prepared from the two blood fractions using a heat treatment and, in all cases, they were characterized by rheological measurements, DSC, scanning electron microscopy, etc. Haemoglobin, which is the main protein of the cell fraction, produced

ABSTRACT

very strong and viscoelastic gels. Decolorized globin gels obtained from haemoglobin also displayed very good results presenting the advantage of having a much more desirable appearance. Plasma gels and some plasma fractions gels have been obtained, presenting all of them great strength and elasticity. In addition, plasma gels synthesized using a gelling agent have been prepared, resulting very viscous gels. In general, these new materials synthesized from blood proteins are products that could be used as thickeners or film to protect food products.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN DE LA MEMORIA

Numerosos residuos procedentes de la industria alimentaria podrían ser susceptibles de ser recuperados y revalorizados. Un ejemplo de ello lo constituye la sangre, que puede considerarse como uno de los subproductos más problemáticos de la industria alimentaria debido a la gran cantidad que se genera y a su alto poder contaminante (Ockerman & Hansen, 2000; Rendueles y cols., 1996). La eliminación de estos residuos constituye un importante coste añadido al proceso de producción, por tanto una solución a este problema sería la posibilidad de incorporar la sangre procedente de mataderos a productos alimenticios. La industria alimentaria podría usar proteínas procedentes de la sangre para adicionarlas a productos dietéticos o de imitación. Las propiedades funcionales de estas proteínas son comparables a productos comerciales como la albúmina de huevo o las proteínas del lactosuero.

Teniendo en cuenta que alrededor del 5% del peso del animal es sangre y que sólo un pequeño porcentaje se usa directamente en productos cárnicos, los residuos de sangre representan millones y millones de toneladas de subproductos. Esto, junto con el alto contenido de sólidos que presenta (18 %) y su alto DQO (500000 mg O₂/L), constituye un importante problema medioambiental de difícil solución. Además, si se considera que uno de los principales componentes de la sangre son proteínas y que estas poseen un elevado valor económico, parece obvio considerar la posibilidad de recuperar las proteínas de la sangre procedente de mataderos (Deutscher, 1990).

Para llevar a cabo la separación y purificación de las proteínas sanguíneas es necesario separar el plasma (Harris, 1989), fracción líquida de la sangre, de la fracción celular. El plasma está constituido básicamente por proteínas (7%), agua (91%) y una gran variedad de sales y compuestos de bajo peso molecular (1%). Las proteínas del plasma son básicamente todas las que existen en la sangre, excepto la hemoglobina, que es la proteína mayoritaria de la fracción celular (Gras, 1983).

Antes de realizar la purificación de las proteínas es necesario eliminar las impurezas, especialmente los iones y sales que contiene el plasma crudo. La separación previa de todos estos componentes del plasma puede mejorar el proceso final de separación y purificación de proteínas. Así mismo, la eliminación de los componentes minerales se hace necesaria si las proteínas van a ser destinadas para alimentación

humana como helados, pasteles, pan, etc. Se conocen numerosas técnicas para eliminar los compuestos inorgánicos del plasma sanguíneo (8). Entre todas ellas destacan dos, el intercambio iónico y la ultrafiltración (Goldsmith & De Filippi, 1971), que son comúnmente utilizadas en la industria. Se intentan encontrar nuevos materiales que permitan que los procesos de intercambio iónico y de membranas mejoren sus condiciones de operación y, por tanto, su eficacia.

El conocimiento de las propiedades funcionales de las proteínas es esencial para poder emplear las mismas como ingredientes que proporcionen las características deseadas a un alimento. Las propiedades funcionales no solo afectan a las características sensoriales de los alimentos sino que también pueden influenciar su comportamiento físico durante la preparación, transformación o almacenamiento. Esto se hace especialmente importante en el caso del plasma, ya que es un sistema multicomponente que presenta diferentes tipos de proteínas. Las principales propiedades que se van a estudiar en este trabajo son la solubilidad, capacidad emulsificante, capacidad espumante y tensión superficial.

Finalmente, se ha considerado la posibilidad de aprovechar las propiedades gelificantes de las diferentes proteínas de la sangre para preparar geles con multitud de usos potenciales. Se elaborarán geles de la principal proteína de la fracción celular, la hemoglobina, geles de las proteínas que constituyen el plasma en su conjunto y geles de cada una de las fracciones proteicas plasmáticas. En todos los casos se realizará una caracterización reológica y física de los mismos, lo que nos permitirá establecer comparaciones a tener en consideración en función de sus aplicaciones posteriores.

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

La presente memoria se encuentra dividida en varios apartados a lo largo de los cuáles se exponen los resultados obtenidos de la recuperación y revalorización de residuos alimenticios con contenido proteico. Además se describen los fundamentos teóricos, los materiales y métodos empleados y las conclusiones a las que se han llegado en cada caso.

Al comienzo de la memoria se encuentra una introducción dónde, además de incluir una justificación de la misma se explica cómo se ha estructurado esta tesis doctoral. A continuación se indican los objetivos perseguidos para, seguidamente, exponer los diferentes capítulos que vertebran el documento aquí presente. El capítulo 1 constituye una exposición teórica sobre la importancia del aprovechamiento de residuos con alto contenido proteico y, en el capítulo 2, se revisa la metodología experimental empleada.

Los capítulos del 3 al 6 constan, cada uno de ellos, de varios artículos (bien publicados, bien aceptados para su publicación o bien enviados para su publicación) estructuralmente relacionados. En el capítulo 3 se analizan dos de los procesos de desmineralización de residuos proteicos que más se utilizan en la industria alimentaria, estudiándose en el capítulo 4 cómo afecta este procesamiento a la estructura y a las propiedades funcionales de las proteínas alimentarias. En concreto se muestra cómo la desmineralización repercute en la desnaturalización de las proteínas, se analizan las propiedades funcionales de los residuos proteicos desmineralizados y se evalúa la posibilidad de recuperar la conformación nativa de proteínas alimentarias a través de un proceso de renaturalización.

En los capítulos 5 y 6 se desarrollan nuevos materiales haciendo uso de las excelentes propiedades funcionales que nos ofrecen determinados residuos alimentarios. Y así, se muestran varios ejemplos prácticos del aprovechamiento de la capacidad gelificante de las diferentes proteínas de la sangre de porcino. Con todas las fracciones sanguíneas se sintetizan geles proteicos susceptibles de ser usados como espesantes o como películas para proteger productos alimenticios, y en todos los casos se lleva a cabo una caracterización reológica de los nuevos productos así como un estudio de sus propiedades térmicas, análisis de la distribución granulométrica de sus partículas, su microestructura y su capacidad de retención de agua. En algunos casos, además, se evalúa el proceso de liofilización como técnica que incrementa la vida útil del producto.

De este modo en el capítulo 5 se recogen los resultados de geles sintetizados con proteínas de la fracción celular a través de un tratamiento térmico inducido, en concreto elaborados a base de hemoglobina y globina decolorada. En el capítulo 6 se muestra el análisis de geles sintetizados con proteínas de la fracción plasmática. Por un lado, se analizan los geles elaborados a partir de soluciones de plasma, tanto a través de

un tratamiento térmico inducido como utilizando una sustancia gelificante (glicerol) y, por otro lado, se recogen los resultados de los geles sintetizados a partir de soluciones de cada una de las fracciones proteicas del plasma (fibrinógeno, γ -globulinas, α y β globulinas y albúminas).

Finalmente, se recogen de forma conjunta las conclusiones que se derivan del trabajo realizado y, en el último apartado, aparecen una serie de apéndices con el fin de aclarar algunos puntos de la memoria que no hubieran sido puestos de manifiesto.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Esta memoria pretende, por un lado, evaluar la influencia de los principales procesos de separación de proteínas utilizados en la industria del procesado de residuos proteicos y, por otro, analizar las posibles aplicaciones tecnológicas de las proteínas aisladas. Concretamente se pretende:

- Comparar dos de los procedimientos de desmineralización de residuos proteicos (en concreto plasma sanguíneo de vacuno), intercambio iónico y ultrafiltración, que permiten eliminar las sales y otras impurezas que acompañan a las proteínas, y facilitar el procesado de las mismas.
- Determinar la desnaturalización sufrida por las proteínas del plasma sometidas a desmineralización, para lo cual se utilizará una técnica de viscosimetría. Analizar la posibilidad de recuperación de la conformación nativa mediante un proceso de renaturalización (refolding).
- Analizar el efecto de la desmineralización en las propiedades funcionales de las proteínas, realizándose el estudio de la solubilidad, capacidad emulsificante, capacidad espumante y tensión superficial.
- Desarrollar geles a partir de las proteínas sanguíneas de la fracción celular (hemoglobina y globina decolorada), a partir de las proteínas plasmáticas conjuntamente y a partir de soluciones de cada una de las fracciones proteicas del plasma (fibrinógeno, γ -globulinas, α y β globulinas y albúminas); utilizando agentes gelificantes (como el glicerol) o a través de un tratamiento térmico inducido. Llevar a cabo la caracterización reológica de los mismos estudiando sus propiedades térmicas y analizando la distribución granulométrica de sus partículas, su microestructura y su capacidad de retención de agua.

CAPÍTULO 1:
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. RESIDUOS ALIMENTICIOS CON CONTENIDO PROTEICO

1.1.1. Sangre animal

1.1.1.1. Composición

La sangre es un líquido viscoso consistente en una suspensión de elementos formes (leucocitos, hematíes y plaquetas) en un medio coloidal (plasma). La sangre es opaca debido al gran número de células presentes y de color rojo a causa de la hemoglobina que portan los eritrocitos (Farreras, 1992). Los leucocitos, los hematíes y las plaquetas reciben el nombre de elementos formes y gracias a que se hayan suspendidos en el plasma, confieren a la sangre su fluidez característica. La sangre es un tejido de origen mesenquimatoso y muy especializado (Stauton, 1969). La proporción de los principales componentes sanguíneos se expone en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentaje de los componentes de la sangre (Ockerman y cols., 1994)

	Sangre entera
Sólidos totales (%)	18-20
Proteína (%)	13-15
Grasa (%)	<1
Carbohidratos (%)	<1
Sales (%)	2
Agua (%)	80-82

El contenido en constituyentes minerales es relativamente constante, porque aseguran un papel tampón y las características físico-químicas de la sangre. Por el contrario, el contenido en grasas e hidratos de carbono es, según el periodo del día, muy variable; lo mismo ocurre para otros nutrientes. Las proteínas ocupan un 75% de los sólidos presentes en la sangre.

La cantidad de sangre en un animal vivo es variable según especie, sexo o edad. En todos los casos, en el proceso de sangrado en el matadero, tan solo es aprovechable un determinado porcentaje respecto al peso vivo del animal, puesto que la canal retendrá

en vasos y capilares un volumen irrecuperable (alrededor del 50%), que también es variable según condiciones de sacrificio, estado fisiológico del animal, etc. De forma aproximada, la cantidad de sangre que es posible obtener por especie animal sacrificada se refleja en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidad de sangre obtenida de los distintos animales de sacrificio (Galiano, 1993)

Especie animal	Total de sangre (% de peso vivo)	Total de sangre (litros)
Vacuno mayor	4.9	15.55
Ternero	5.2	10.65
Cerdo	3.2	3.50
Ovino y caprino	4.1	1.90
Caballar	6.4	27.00

A pesar de esta complejidad y de los continuos intercambios a través de la pared capilar entre la sangre y los diferentes tejidos, el plasma presenta unos caracteres fisicoquímicos casi constantes, hecho que se califica de homeostasis, o isoestructura isoplasmática. Los elementos formes que la sangre lleva en suspensión constituyen aproximadamente un poco menos de la mitad de su masa total. La relación entre el volumen de los elementos formes o células (aunque este término no es del todo exacto, ya que los eritrocitos y las plaquetas no son auténticas células) y la masa total de sangre se denomina hematocrito. Su valor normal medio es de 45%, para los elementos formes (Stauton, 1969).

1.1.1.2. Características físicas

Algunas de las características físicas de la sangre animal son:

Densidad: La sangre tiene aproximadamente una densidad de 1.05 kg/L. Si separamos la misma en sus dos principales componentes, plasma y células, cada uno de éstos tiene a su vez una densidad de 1.03 y 1.09 kg/L, respectivamente. Estos valores son asimismo valores medios. Según la especie también varía la densidad ligeramente, en el caso de

sangre de oveja es de 1.06 kg/L aproximadamente, mientras que en el caso de la cerda es de 1.04 kg/L.

pH: El pH de la sangre oscila entre 7.2 y 7.5 a una temperatura de 20° C. Es por tanto neutro o ligeramente básico.

Punto de congelación: Alrededor de -0.55° C.

Viscosidad: Entre 3.6 y 5.3 cp, de 3 a 5 veces superior a la del agua.

1.1.1.3. Fracciones. plasma/ suero y elementos formes

a. Plasma/suero

El plasma sanguíneo es un líquido claro de color amarillento o anaranjado, y ligeramente viscoso. Se debe hacer una distinción entre plasma y suero sanguíneo. El plasma se obtiene por adición de sustancias anticoagulantes a la sangre recién obtenida, que impiden la formación de redes de fibrina y posterior separación de las células, generalmente por procesos de centrifugación. El suero sanguíneo, por el contrario, se obtiene desfibrinando la sangre, esto es, forzando la coagulación de la misma formándose grandes mallas fibrinosas (coágulos) mediante agitación con paletas, que son retenidas posteriormente (Prandl y cols., 1994). Tras ello se somete a centrifugación y se separan así las células del suero sanguíneo. La única diferencia en cuanto a composición se refiere es la presencia de la proteína fibrinógeno en el plasma y la ausencia en el suero. En la Figura 1 se muestra el esquema del fraccionamiento de la sangre para obtener plasma o suero.

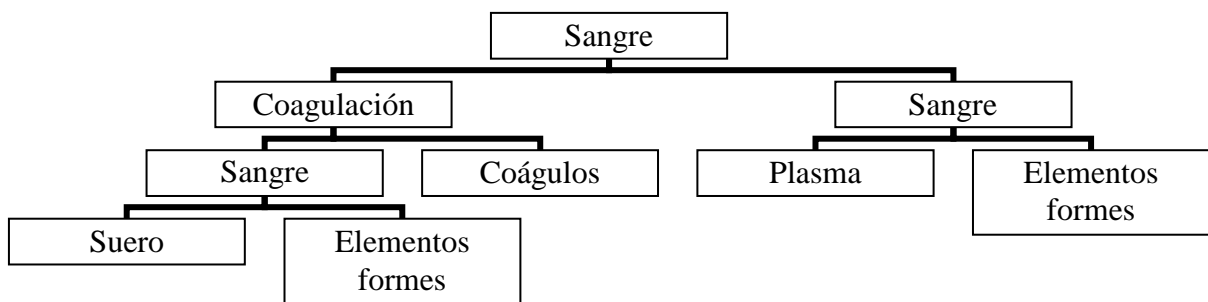


Fig.1. Esquema del fraccionamiento de la sangre.

Para la realización de esta tesis se eligió el plasma en vez del suero debido a varias razones:

- **Composición proteica.** El plasma contiene una proteína más que el suero, el fibrinógeno. El fibrinógeno es una proteína de elevada importancia sobre todo desde el punto de vista de su uso en medicina. Separarla y purificarla ayudará a rentabilizar todo el proceso de aprovechamiento de sangre en mataderos. Sin embargo, su conversión en fibrina es irreversible y la única posibilidad es tratarla como un desecho.
- **Viabilidad para su obtención.** El plasma requiere la adición de un anticoagulante de coste reducido y de fácil manejo. Por el contrario, para la obtención de suero es necesario disponer de un equipo de agitación, con un tipo de paletas determinado y un buen control de la velocidad de agitación ya que de no ser así, la agitación mecánica puede romper las células produciendo la liberación de la hemoglobina al suero. Por otra parte, la eliminación de los coágulos de fibrina sería engorroso y traería problemas de contaminación, ya se está generando un subproducto de difícil utilización.

El plasma está constituido fundamentalmente por un 9% de sólidos y un 90% de agua. Su composición es prácticamente idéntica a la del suero. Contiene numerosas sustancias y elementos en solución, cuya proporción suele mantenerse constante, y que en valores medios, puede cifrarse de la siguiente forma (Stauton, 1969), por cada 100 mL:

A. Elementos minerales

Tabla 3. Composición de cationes del plasma sanguíneo

Cationes	Valor medio (en 100mL)
Calcio	10-12 mg
Potasio	18-20 mg
Magnesio	1.3-3.5 mg
Hierro	0.9-1.2 mg
Cobre	1-1.4 mg
Sodio	300-350 mg

Tabla 4. Composición de aniones del plasma sanguíneo

Aniones	Valor medio (en 100 mL)
Cloruros	340-380 mg
Carbonatos	150-170 mg
Fosfatos	12-15 mg
Sulfatos	3-5 mg
Bromuro	0.8-1.8 mg
Yoduro	0.8-1.3 mg
Fluoruro	1-1.2 mg

B. Derivados de las proteínas

Tabla 5. Composición de derivados proteicos del plasma sanguíneo

Derivados proteicos	Valor medio (en 100 mL)
Urea	20-40 mg
Nitrógeno de los aminoácidos	1.5-3 mg
Ácido úrico	3-5 mg
Creatina total	3.8 mg

C. Glúcidos y derivados metabólicos

Tabla 6. Composición de glúcidos y derivados metabólicos del plasma sanguíneo

Glúcidos y derivados metabólicos	Valor medio (en 100 mL)
Glucosa	80-120 mg
Glucógeno	25-75 mg
Ácido láctico	10-20 mg
Ácido oxálico	1-5 mg
Alcohol etílico	3-4 mg

D. Otras sustancias

Tabla 7. Composición de otras sustancias del plasma sanguíneo

Otras sustancias	Valor medio (en 100 mL)
Bilirrubina	0.4-1 mg
Amilasa	0.08-0.32 mg
Fosfatasas alcalinas	0.05-0.09 mg
Fosfatasas ácidas	0.01-0.06 mg

En la Tabla 8 se muestra la composición porcentual de los componentes del plasma íntegro y desecado. Dentro de la fracción sólida, la proteína es la que se encuentra en mayor proporción, entre el 90 y el 95%, lo cual equivale a un 6-8% en el

plasma íntegro. Las proteínas plasmáticas se dividen principalmente en dos grandes fracciones que incluyen una gran cantidad de proteínas: globulinas, fracción precipitada o salinizada por semisaturación con sulfato amónico, y albúminas, fracción precipitada por saturación completa con sulfato amónico. Dentro de la fracción globulina precipita una proteína que por tener unas características muy especiales y diferentes al resto de globulinas, el fibrinógeno, será objeto de estudio desvinculado de las globulinas. La composición de las distintas especies proteicas integrantes varía según la especie animal. En la Tabla 9 se muestran los porcentajes de las distintas especies proteicas plasmáticas en la especie bovina.

Tabla 8. Composición química del plasma bovino (Ockerman&Hansen, 1994)

	Plasma sanguíneo	Plasma desecado
Sólidos totales (%)	8-9	96-97.5
Proteína (%)	6-8	70-96
Grasa (%)	0.1-1	0-1.5
Carbohidratos (%)	<1	-
Sales (%)	1.5	<2
Agua (%)	90-91	2.5-7

Tabla 9. Porcentaje de las distintas fracciones proteicas del plasma bovino

PROTEÍNA	% EN PLASMA BOVINO
<u>Fracción albúmina:</u>	42
Prealbúmina	0.3
Albúmina	41
<u>Fracción globulina:</u>	56
α -Globulina	14
β -Globulina	11
γ -Globulina	31
<u>Fibrinógeno:</u>	2

b. Elementos formes

Se engloban en este grupo los hematíes o glóbulos rojos, las plaquetas y los leucocitos o glóbulos blancos. Los valores normales medios por mm^3 son de 4.5×10^6 - 5×10^6 para los hematíes, 15×10^4 - 3×10^5 para las plaquetas y 6×10^3 - 9×10^3 para los leucocitos. La existencia de otras formas celulares, a no ser que se trate de proporciones mínimas, tiene carácter patológico. Así pues la mayor parte de estos elementos formes son hematíes que contienen en su interior la hemoglobina (proteína que representa alrededor de dos tercios de la masa de las proteínas de la sangre, y las proteínas del plasma constituyen el otro tercio). Las proteínas de los leucocitos y plaquetas, representan cantidades insignificantes del total de proteínas de la sangre.

La fracción de elementos formes plantea un problema en el aprovechamiento de proteínas de las células. Por un lado esta fracción representa el 40% del volumen de sangre inicial y a la vez contiene una gran proporción de la proteína total de la misma (60%). Desechar esta fracción supondría una gran contradicción con todo lo aquí planteado: pérdida de un producto de alto valor y contaminación del lugar donde se vierta. Es necesario pues, desarrollar y revalorizar el contenido de la misma y rentabilizar el proceso global de aprovechamiento de sangre de animales de abasto.

1.1.2. Lisozima de clara de huevo

La lisozima es una proteína de origen animal contenida en la clara de huevo. Se trata de un producto asimilable a las proteínas que contiene el plasma sanguíneo. Se ha utilizado en esta memoria ya que, a diferencia de las proteínas del plasma sanguíneo, presenta actividad enzimática. Por ello, se ha utilizado para evaluar la renaturalización de proteínas que han sufrido un proceso de desnaturalización.

La lisozima es una enzima muy ampliamente distribuida entre los seres vivos, desde virus a organismos eucariotas. La lisozima de clara de huevo está formada por una cadena polipeptídica de 129 aminoácidos con cuatro enlaces disulfuro. La molécula tiene forma más o menos helicoidal, compuesta por varias hélices alfa y una lámina beta extendida formada por tres hojas beta (Cheftel, 1989). Su acción catalítica consiste en la rotura del enlace glicosídico beta (1-4) característico de los

peptidoglicanos bacterianos cuyo disacárido constitutivo es N-acetil glucosamina (NAG)- N-acetil murámico (NAM).

En el centro catalítico encontramos dos aminoácidos ácidos. Se trata de una catalisis ácido-base, en la que intervienen dos aminoácidos ácidos (Glu 35 y Asp 52), estos se encuentran a ambos lados del enlace glucosídico b. El entorno de cada uno de los residuos determina su papel en el proceso catalítico. Glu 35 y Asp 52 son fundamentales en la acción catalítica. El pH tiene influencia en este mecanismo de catálisis porque cuando este aumenta el Glu se ioniza, mientras que si el pH disminuye es el Asp el que se protona. Su rasgo más llamativo es una hendidura (centro activo), en el sitio de fijación del sustrato que atraviesa la cara de la molécula, siendo su plegamiento más complejo.

1.2. PROCESOS DE DESMINERALIZACIÓN

Una vez descritos los principales residuos alimenticios usados en esta memoria, se va a realizar una revisión teórica del procesado al que se ha visto sometida la sangre animal. Tal y como se ha indicado en la introducción, la sangre animal procedente de los mataderos es uno de los principales subproductos de la industria alimentaria. En esta tesis doctoral se plantea la posibilidad de recuperar las proteínas que presenta una de sus fracciones, la plasmática, para poder adicionarlas a diferentes productos alimenticios. Para optimizar este cometido se hace necesario llevar a cabo la separación de los componentes minerales que contiene el plasma.

El gran número de iones presentes en el plasma puede interferir y competir con las proteínas según la técnica de desmineralización utilizada, y los compuestos orgánicos de bajo peso molecular pueden dar lugar a reacciones de descomposición, potenciar el crecimiento bacteriano e interferir en el análisis cromatográfico. La separación previa de todos estos compuestos de las proteínas plasmáticas puede mejorar por un lado, la manejabilidad del plasma y, por otro, facilitar la etapa de separación y purificación final de las proteínas. Además la eliminación de la materia mineral del plasma suele ser necesaria si se desea usar en productos para alimentación humana como helados, repostería, pastelería, panadería, etc. (Fernández & Díaz, 1995).

Las técnicas existentes hoy en día para llevar a cabo la eliminación de los componentes inorgánicos del plasma sanguíneo son el intercambio iónico, los procesos de membranas y los procesos de secado, bien el secado tradicional y/o el secado por atomización. En este trabajo se han utilizado dos de ellas, el intercambio iónico y la ultrafiltración, ya que los procesos de secado son válidos cuando el producto se va a utilizar directamente y no como etapa previa para una separación y purificación posterior (Real del Sol & Martín Yero, 1991).

1.2.1. Desmineralización por intercambio iónico

El plasma es un líquido en el que se encuentran inmersos gran cantidad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, que aunque muchos de ellos están en baja proporción, pueden afectar al equilibrio de intercambio iónico en etapas posteriores de separación. Los iones inorgánicos constituyen alrededor del 1% del plasma total.

Los intercambiadores iónicos son matrices sólidas que contienen sitios activos (también llamados grupos ionogénicos) con carga electrostática, positiva o negativa, neutralizada por un ión de carga opuesta (contraión). En estos sitios activos tiene lugar la reacción de intercambio iónico. A medida que la disolución pasa a través de la resina, los iones presentes en dicha disolución desplazan a los que estaban originariamente en los sitios activos. La eficiencia de este proceso depende de factores como la afinidad de la resina por un ión en particular, el pH de la disolución si el grupo activo tiene carácter ácido y básico, la concentración de iones o la temperatura.

1.2.1.1. Intercambio iónico en columna

Esta configuración es la que se emplea más a menudo en los procesos de intercambio iónico. El intercambiador se coloca en el interior de una columna vertical, a través de la cual fluye la disolución a tratar. El proceso global consta de varias etapas que a continuación se describen brevemente.

a. Empaquetamiento de la columna

Consiste en introducir el intercambiador en el interior de la columna evitando la formación de bolsas de aire entre sus partículas para así obtener un lecho uniforme. Esta operación se realiza habitualmente lavando el intercambiador con agua destilada, que además resulta útil para eliminar posibles impurezas y para evitar el fenómeno de hinchamiento. El hinchamiento puede causar graves problemas si tiene lugar cuando el intercambiador se encuentra confinado en la columna y no se ha dejado espacio suficiente para alojarlo una vez se ha incrementado su volumen (Jayaswal y cols., 2001).

b. Acondicionamiento del intercambiador

Muchas resinas comerciales se venden en una forma iónica que puede no ser la adecuada para el tratamiento que se desea realizar. Por ejemplo, una resina básica fuerte que tenga como contraión un grupo OH^- y que, por necesidades del proceso, sea deseable tener un ión Cl^- (Natarajan & Cramer, 2000). En la etapa de acondicionamiento se procede a cambiar el contraión de la resina poniéndola en contacto con una disolución concentrada del ión que se desea tener. Una vez se ha conseguido este objetivo y la resina está en la forma iónica deseada, debe eliminarse el exceso de esta disolución lavando la resina con agua destilada.

c. Etapa de carga

En esta etapa tiene lugar el intercambio de iones entre la disolución a tratar y el intercambiador. La disolución a tratar se introduce en la columna y fluye gradualmente a través del intercambiador. Las condiciones de operación (velocidad de flujo, pH de la disolución, etc.) dependerán del tipo de intercambiador utilizado, y es importante optimizarlas para obtener un buen rendimiento en cuanto a capacidad y selectividad.

Cuando el intercambiador comienza a estar saturado con los iones de la disolución que entra, se observa un aumento de la concentración de dichos iones en la disolución que sale de la columna. Esta descarga de iones se conoce como punto de ruptura, e indica que el tratamiento de la disolución por el intercambiador ya no está siendo efectivo. Una vez la concentración de estos iones en la disolución de salida iguala a la de la concentración de entrada, el intercambiador ha agotado toda su capacidad de intercambio en las condiciones de operación.

d. Etapa de regeneración

La etapa de regeneración consiste en devolver el intercambiador saturado a su forma iónica inicial, empleando una disolución concentrada en el ión originariamente asociado al intercambiador (por ejemplo, un ácido mineral para una resina ácida fuerte). Esta etapa es importante en el proceso de intercambio iónico ya que el buen funcionamiento del intercambiador en sucesivos procesos de carga depende de una regeneración eficiente.

Para obtener el máximo rendimiento de esta etapa es importante optimizar parámetros como la concentración y volumen de disolución regenerante así como la velocidad de flujo (Ernest y cols, 1997).

1.2.2. Desmineralización por técnicas de membranas

La filtración es la separación de partículas sólidas a partir de un fluido haciendo pasar éste a través de un medio filtrante, en este caso membranas, sobre el que se depositan los sólidos. El fluido circula a través del medio filtrante en virtud de una diferencia de presión a través del medio. Así, los filtros se clasifican atendiendo a este aspecto en los que operan con una sobrepresión aguas arriba del medio filtrante, los que lo hacen con presión atmosférica aguas arriba del medio filtrante y aquellos que presentan vacío aguas abajo.

Presiones superiores a la atmosférica pueden generarse por acción de la gravedad actuando sobre una columna de líquido, por medio de una bomba o soplante, o bien por medio de la fuerza centrífuga. Dependiendo de la fuerza impulsora y de la membrana, los procesos se pueden clasificar en microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa. En la Tabla 10 se muestran los parámetros que caracterizan cada proceso.

Tabla 10. Parámetros de los distintos procesos de filtración

Procesos con membrabas	Presión	Tamaño de poro	Flujo del permeado
MF	0-4 bar	0.2-1.8 μm	>100 L/hm ²
UF	2-10 bar	10^{-3} - 2×10^{-2} μm	20-150 L/hm ²
NF	10-25 bar	< 10^{-3} μm	<50 L/hm ²
OI	20-100 bar	Memb. densa	<30 L/hm ²

En los procesos con membranas se obtienen dos fracciones: un concentrado o retenido y un permeado, y el flujo puede ser tangencial o, como en este caso, transversal. El proceso transversal puede asemejarse con una filtración horizontal en la cual se va formando una torta que implica una disminución en la densidad de flujo de permeado (J), haciendo de segundo filtro. La torta filtrante, también llamada capa de polarización, crece hasta alcanzar un equilibrio en el que logra un espesor constante que contribuye a la separación (polarización por concentración). En realidad se produce una obturación de los poros de la membrana. Alguno de los sólidos con tamaños próximos al corte de la membrana, se incrustan en esos poros, lo que supone una disminución del flujo con el tiempo. Esto requiere una limpieza de la membrana con las consiguientes paradas de la operación. El ensuciamiento constante de las membranas por obturación es el factor que más afecta a la vida de éstas, incluso más que el propio proceso. En ello influye la frecuencia y las condiciones de lavado. La regla fundamental del lavado es no dejar nunca en contacto las membranas con la alimentación cuando se pare el proceso ya que podrían cristalizar sustancias en el poro produciendo un daño irreversible. De forma general se dice que una membrana está limpia cuando el flujo con agua, con unas determinadas condiciones de trabajo, es igual al flujo de lavado con agua en las mismas condiciones (Buttenworth, 1992).

Los ciclos de lavado dependen del tipo de proceso que se ha llevado a cabo. Un protocolo general incluye las siguientes etapas:

1. Lavado con agua para arrastrar todo aquello depositado en la membrana.
2. Lavado con solución alcalina, por ejemplo NaOH 0.1N, para eliminar componentes inorgánicos incrustados en los poros.

3. Lavado con agua para producir el arrastre del exceso de agente alcalino y los restos orgánicos que hayan sido arrastrados.
4. Lavado con solución ácida, por ejemplo HCl 0.1N, para eliminar cualquier componente inorgánico y de naturaleza metálica.
5. Lavado con agua para arrastrar el exceso de agente ácido y las impurezas arrastradas por éste, y dejar la membrana con pH neutro.
6. Una vez finalizado el ciclo de limpieza, las membranas suelen conservarse en frío, manteniéndolas sumergidas en una solución de NaOH 0.1N hasta su próxima utilización.

Para determinar la eficacia de una membrana en procesos de separación de solutos existe un parámetro que relaciona la concentración de un soluto en el permeado (C_{pi}) con la concentración del mismo en el retenido (C_{ri}).

$$\sigma_i = 1 - \frac{C_{pi}}{C_{ri}} \quad (1)$$

Teóricamente, si una sustancia tiene un tamaño por encima del corte de la membrana, el rechazo σ_i de ésta por el soluto será 1, y si es inferior será 0. Pero en realidad en las membranas siempre hay una distribución de tamaños de poro, es decir, no todos tienen el tamaño de corte especificado y esto implica que la selectividad no sea perfecta. Según esto, en un proceso en un proceso de separación con membranas, además del diámetro del poro, influye la polarización por concentración (disminuye el corte) y la distribución de tamaños (pueden pasar moléculas que tengan un tamaño superior al corte).

El estudio de una operación de filtración se hace generalmente siguiendo la distribución de los parámetros de interés respecto al factor de concentración volumétrica (FCV) definido como:

$$FCV = \frac{\text{Volumen de alimentación}}{\text{Volumen de retenido}} \quad (2)$$

Este parámetro representa el transcurso de la operación a medida que se concentra la solución de partida debido al volumen de la misma que permea a través de los poros de la membrana.

1.2.2.1. Ultrafiltración

La ultrafiltración es una operación de separación que comparte características de una filtración "normal" y de la ósmosis inversa.

La ultrafiltración se usa para separar partículas con un peso molecular superior a 10 KDa del disolvente que las contiene. Por ello encontrará particular aplicación en la separación de productos bioquímicos (proteínas, polisacáricos) y metales complejados (Cheryan, 1986).

Existen varios tipos de membranas de ultrafiltración para aplicaciones diferentes:

1. Membranas espirales. Permiten que el agua a filtrar recorra toda la membrana y sea recogida en un canal central. Reduce costes de energía al reducir requerimientos de bombeo. Se puede operar a altas presiones y altas temperaturas.
2. Membranas tubulares (de ½" o 1" de diámetro). Trabaja muy bien en altas concentraciones de solutos, su limpieza puede ser tanto química como mecánica y su taponamiento es mínimo. Soporta altas temperaturas y altos rangos de pH.
3. Membranas fibra hueca (HollowFiber). Proporcionan un área de filtración muy amplia en un mínimo espacio.

1.3. DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La desmineralización del plasma sanguíneo permite, por un lado, optimizar su procesamiento pero, por otro, puede causar daños en la conformación nativa de las proteínas presentes en dicha fracción. Por ello, en el siguiente apartado se revisa el concepto de desnaturalización proteica y se plantea la posibilidad de recuperar la actividad biológica de las proteínas mediante un proceso de renaturalización.

1.3.1. Proceso de desnaturalización

La conformación de una proteína basada en sus estructuras secundaria y terciaria es frágil. Por ello, el tratamiento de las proteínas por los ácidos, por las bases, soluciones salinas concentradas, disolventes, calor, radiaciones, etc., puede modificar, de una forma más o menos importante, esta conformación. La desnaturalización proteica puede definirse como cualquier modificación de su conformación (a nivel de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria) que no vaya acompañada de la ruptura de los enlaces peptídicos implicados en la estructura primaria (Cantor & Schimmel, 1980).

La desnaturalización es un fenómeno complejo durante el cual aparecen conformaciones nuevas, frecuentemente fugaces y efímeras (Lehninger, 1978). El estado final de la desnaturalización puede corresponder a una estructura polipeptídica, totalmente desplegada (unfolded), en la que son transitorias las interacciones intraproteicas y proteínas disolventes (Figura 2). Sin embargo, un aumento del nivel de estructura, por encima del nivel de la estructura natural, también debe considerarse como una forma de desnaturalización. Algunas proteínas ya están en su forma natural desplegadas (monómeros de algunas caseínas) lo que explica su estabilidad frente a determinados agentes desnaturalizantes, como por ejemplo el calor.

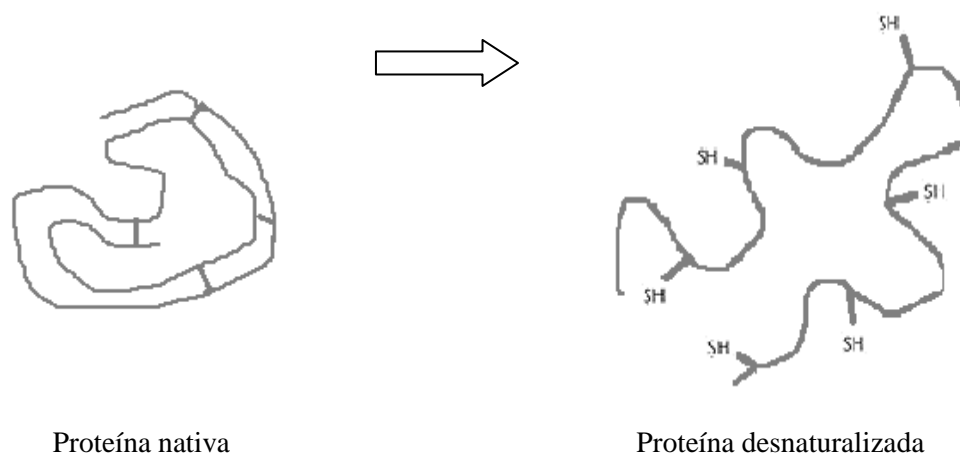


Fig. 2. Esquema del proceso de desnaturalización de una proteína.

Los efectos de la desnaturalización son numerosos y entre ellos se pueden citar:

1. El descenso de la solubilidad resultado del desbloqueo de grupos hidrófobos
2. La alteración de la capacidad de fijación de agua
3. La pérdida de actividad biológica (por ejemplo enzimática o/y inmunológica)
4. El aumento de la sensibilidad al ataque de las proteasas, debido al desbloqueo de enlaces peptídicos correspondientes a los sitios de acción específica de las proteasas
5. El aumento de la viscosidad intrínseca
6. Su incapacidad a la cristalización

La desnaturalización de las proteínas puede medirse por su constante de sedimentación en una ultracentrífuga o bien por su viscosidad, emigración en un campo eléctrico (electroforesis); dispersión óptica rotatoria, propiedades termodinámicas (calorimetría diferencial), propiedades biológicas e inmunológicas, reactividad de algunos grupos funcionales y por dicroísmo circular (Privalov y cols., 1989). La sensibilidad de una proteína a la desnaturalización está en función de la velocidad con la cual el agente desnaturante rompe las interacciones o enlaces que establecen las estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias.

1.3.2. Proceso de renaturalización

La desnaturalización puede ser reversible o irreversible pero cuando se rompen los enlaces disulfuro que contribuyen a la conformación de las proteínas, la desnaturalización es, normalmente, irreversible (Mahler&Cordes, 1971). El proceso mediante el cual la proteína desnaturalizada recupera su estructura nativa se llama renaturalización (refolding). Se denomina estructura primaria a aquella que contiene la información necesaria y suficiente para adoptar niveles superiores de estructuración. Esta propiedad es de gran utilidad durante los procesos de aislamiento y purificación de proteínas, ya que no todas las proteínas reaccionan de igual forma ante un cambio en el medio donde se encuentra disuelta. En algunos casos, la desnaturalización conduce a la pérdida total de la solubilidad, con lo que la proteína precipita. La formación de agregados fuertemente hidrofóbicos impide su renaturalización, y hacen que el proceso sea irreversible (De Bernandez, 2001).

A continuación se muestra un esquema del proceso de renaturalización (refolding) en el que se parte de proteínas desnaturalizadas que presentan una conformación desplegada (Fig.3). El efecto de un agente renaturalizante puede hacer que recuperen su estructura plegada hasta alcanzar la conformación nativa. Para que tenga lugar la renaturalización deben cumplirse dos requisitos:

- La concentración salina debe ser alta ([NaCl] entre 0,15 y 0,5 M) para eliminar la repulsión entre los grupos fosfato de las dos hebras.
- La temperatura deber ser lo suficientemente elevada como para romper los puentes de hidrógeno intracatenarios producidos al azar en el DNA monocatenario, y lo suficientemente baja como para estabilizar los apareamientos correctos entre las bases de hebras distintas.

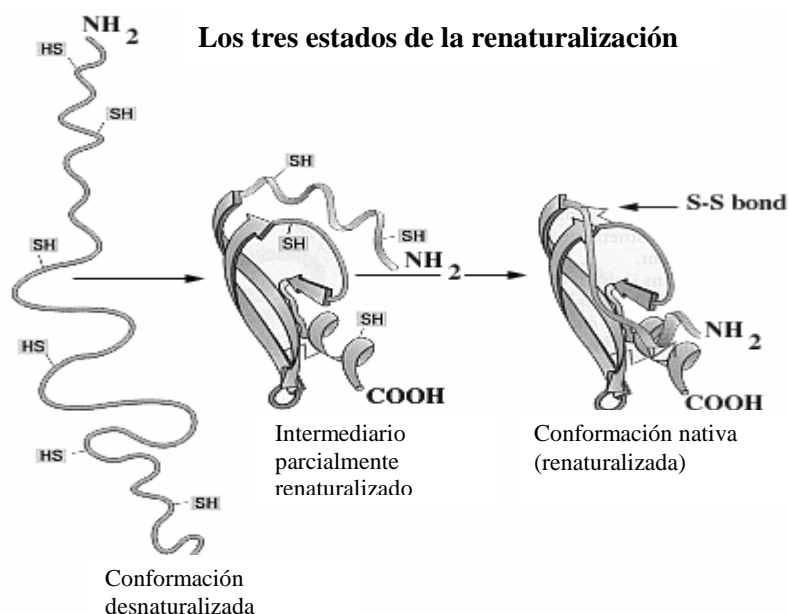


Fig.3. Esquema del proceso de renaturalización (refolding).

(http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biolgia/docencia/FMBvirtual/CultbBact/Reque.htm)

1.4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS Y SU APLICACIÓN TECNOLÓGICA

El plasma sanguíneo procesado puede presentar multitud de usos potenciales. Para conocer cómo afectará la adición del plasma a un producto alimenticio es necesario analizar sus propiedades funcionales.

Las propiedades funcionales de las proteínas son propiedades físico-químicas que les permiten contribuir a las características organolépticas de un alimento. Son varias las propiedades funcionales que intervienen habitualmente en cada alimento (Rendueles y cols, 1996).

Las propiedades funcionales de las proteínas alimenticias, pueden clasificarse en tres grupos principales:

1. Propiedades de hidratación (dependiente de las interacciones proteína-agua).
2. Propiedades dependientes de las interacciones proteína-proteína.
3. Propiedades superficiales.

El primer grupo incluye propiedades tales como la absorción y la retención de agua, succulencia, hinchado, adhesión, dispersabilidad, solubilidad y viscosidad. El segundo grupo de propiedades interviene en fenómenos tales como la precipitación, gelificación y formación de otras estructuras diferentes (fibras y pastas proteicas, por ejemplo). El tercer grupo se refiere a la tensión superficial de emulsificación y características espumantes de las proteínas. Estos grupos no son totalmente independientes; por ejemplo, la gelificación no solamente implica las interacciones proteína-proteína, sino también las interacciones agua-proteína y la viscosidad y la solubilidad dependen una y otra de las interacciones proteína-agua y proteína-proteína.

1.4.1. Propiedades de hidratación

La conformación de una proteína en solución depende, fundamentalmente, de sus interacciones con el agua. La mayor parte de los alimentos son sistemas sólidos hidratados y el comportamiento físico-químico y reológico de las proteínas y los otros constituyentes del alimento, está influenciado, no solo por la presencia de agua sino también por la actividad del agua. Por otro lado, para utilizar los concentrados y aislados secos de proteína hay que hidratarlos, por esta razón, es de gran interés práctico estudiar las propiedades de hidratación y rehidratación de las proteínas alimenticias.

Muchas de las propiedades funcionales de una solución proteica están en relación con esa hidratación progresiva, la absorción de agua (llamada también afinidad, fijación de agua), el hinchamiento, mojabilidad, dispersabilidad y viscosidad. El estado final de la proteína, soluble o insoluble, también está en relación con importantes propiedades funcionales, tales como la solubilidad o la solubilidad instantánea. La gelificación implica la formación de una masa insoluble bien hidratada, pero las interacciones proteína-proteína también son necesarias. Las propiedades superficiales tales como la emulsificación y formación de espuma, necesitan unas elevadas tasas de hidratación y dispersión (Cheftel, 1989).

Diversos factores como la concentración, pH, temperatura, tiempo, fuerza iónica y presencia de otros constituyentes, afectan a las fuerzas que intervienen entre las interacciones proteína-proteína, y proteína-agua. La mayoría de las propiedades funcionales vienen determinadas por el equilibrio entre estas fuerzas.

Las variaciones de pH al modificar la ionización y carga neta de la molécula proteica alteran las fuerzas atractivas y repulsivas entre las proteínas y la capacidad de estas últimas para asociarse con el agua.

La elevación de la temperatura disminuye la fijación de agua por parte de las proteínas debido a la disminución de los enlaces de hidrógeno. El tamaño, la porosidad superficial y porosidad interna de las partículas proteicas deshidratantes también influyen en la velocidad e intensidad de la absorción de agua. El aumento de absorción y retención de agua de las proteínas miofibrilares en presencia de cloruro de sodio puede explicarse por la fijación de iones y la apertura de la red proteica.

1.4.2. Solubilidad

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

La solubilidad depende fundamentalmente del pH, fuerza iónica, tipo de disolvente y temperatura.

- a. **Influencia del pH.** Una proteína en disoluciones de pH inferior o superior al punto isoeléctrico, tiene una carga positiva o negativa y las moléculas de agua reaccionan con estas cargas contribuyendo así a su solubilización.

- b. Influencia de la fuerza iónica. Los iones reaccionan con las cargas de las proteínas y rebajan la atracción electrostática entre las cargas opuestas de grupos próximos, esto aumenta la solvatación de las proteínas y por tanto su solubilidad.
- c. Influencia de los disolventes. La adición de algunos disolventes, tales como el etanol o la acetona, rebaja la constante dieléctrica del medio. De esta forma disminuyen las fuerzas electrostáticas de repulsión existentes entre las moléculas proteicas, lo que contribuye a su agregación y precipitación.
- d. Influencia de la temperatura (a pH y fuerza iónica constantes). La solubilidad de las proteínas aumenta cuando la temperatura se eleva de 0 a 40-50°C. Por encima de los 40-50°C el movimiento de las moléculas es suficiente para romper los enlaces implicados en la estabilización de las estructuras secundaria y terciaria. Esta desnaturalización va seguida, frecuentemente, de una agregación y la solubilidad de la proteína desnaturalizada llega a ser inferior a la de la proteína natural. Sin embargo, la capacidad de las proteínas desnaturalizadas para fijar agua sólo queda ligeramente modificada; incluso a veces aumenta.

1.4.3. Propiedades emulsificantes

Las emulsiones son dispersiones en dos líquidos no miscibles o parcialmente miscibles, de los cuales uno se concentra bajo la forma de una fase continua dispersante. La mayor parte de las emulsiones alimenticias son del tipo aceite en agua (Ac/Ag) o bien agua en aceite (Ag/Ac). El término “agua” designa un líquido polar hidrófilo que generalmente es una solución acuosa, mientras que el término “aceite” indica un líquido hidrófobo (grasa fundida, aceite vegetal o animal, aceites esenciales).

Muchas emulsiones alimenticias contienen gotitas de gas y/o sólidos dispersos. En la mayoría de los casos el diámetro de las gotitas líquidas dispersas está comprendido entre 0.1 y 50µm. La formación de las gotitas va pareja con la creación de una superficie interfacial importante entre las dos fases líquidas no miscibles, la cual aumenta exponencialmente cuando el diámetro de las gotitas disminuye.

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

- a. Temperatura, pH y fuerza iónica
- b. Concentración en proteína soluble, naturaleza de la proteína
- c. Características del aceite (punto de fusión, velocidad de adición del aceite, volumen de la fase lipídica)
- d. Presencia de azúcares, de surfactantes de baja masa molecular y exposición al oxígeno
- e. Tipo y diseño del equipo, intensidad del aporte energético

1.4.4. Propiedades espumantes

Las espumas son dispersiones de gotas de gas en fase continua líquida o semi-sólida que contienen una sustancia soluble con propiedades surfactantes. Existe una gran variedad de espumas o batidos alimenticios, de consistencia muy diversa, tales como el merengue y algunos otros productos de pastelería-confitería. El gas es el aire (eventualmente carbónico) y la fase continua o suspensión acuosa es la que contiene las proteínas. En las espumas hay una fase continua de capas líquidas delgadas, llamadas laminillas, que separa las burbujas de gas (Cheftel, 1989).

La interfase gas/líquido puede alcanzar 1 m/mL de líquido, se necesita energía mecánica para crear esta interfase. Para mantener la interfase contra la coalescencia de las burbujas de gas se necesita la presencia de agentes de superficie que rebajen la tensión de la interfase y formen una barrera protectora elástica entre las burbujas de gas atrapadas. Algunas proteínas pueden formar una película protectora que se adsorbe en la interfase gas/líquido.

Los factores que intervienen en la formación de espuma son los siguientes:

- a. La solubilidad. Numerosos estudios señalan la importancia que tiene la solubilidad de las proteínas para que se manifieste una buena capacidad espumante y una buena estabilidad, pero se acepta que las partículas proteicas insolubles tales como las proteínas miofibrilares, las micelas y otras proteínas en su pI pueden tener un papel beneficioso en la estabilización de las espumas, aumentado, probablemente, la viscosidad superficial.
- b. Las sales. Las sales pueden influir en la solubilidad, viscosidad, desdoblamiento y agregación de las proteínas, por lo que pueden alterar las propiedades espumantes.

- c. Los azúcares. La sacarosa y otros azúcares reducen la expansión de la espuma pero mejoran su estabilidad porque aumentan la viscosidad global de las espumas.
- d. Los lípidos. Concentraciones mínimas de lípidos contaminantes (0.1%) alteran fuertemente las propiedades espumantes de las proteínas. Así por ejemplo, las proteínas de clara de huevo exentas de lípidos de la yema tienen mejores propiedades espumantes que cuando están contaminadas. Los lípidos tensoactivos y polares, impiden una conformación favorable de las películas de proteínas adsorbidas al colocarse en la interfase aire-agua.
- e. La concentración proteica. Al aumentar la concentración proteica en un margen amplio (hasta un 10%), la estabilidad de la espuma aumenta más que el volumen. Se alcanzan los aumentos máximos la concentración proteica en la fase líquida inicial es del orden del 2 al 8% (P/V).
- f. Duración e intensidad de la agitación. Para conseguir una espuma satisfactoria, es preciso que la duración e intensidad de la agitación logre un desdoblamiento y absorción adecuada de la proteína. Sin embargo, una agitación demasiado intensa, puede disminuir el crecimiento y estabilidad de la espuma. La clara de huevo es muy sensible al exceso de batido.
- g. Tratamientos térmicos. Ciertos tratamientos térmicos moderados, realizados antes de la formación de espuma, mejoran algunas propiedades espumantes de las proteínas. Estos tratamientos térmicos producen unos incrementos del volumen de espuma. El calentamiento de espumas provoca una expansión del aire, un descenso de la viscosidad, la rotura de burbujas y el derrumbe de la red, salvo que la gelificación de la proteína contribuya a crear una rigidez en la película adsorbida que sea suficiente para estabilizar la espuma.

1.4.5. Tensión superficial

Otra de las propiedades funcionales a considerar es la tensión superficial como forma de medir los desequilibrios de fuerzas en la interfase gas/líquido. Las moléculas de líquido situadas en la superficie son atraídas hacia el seno del líquido por una energía libre superficial, este mismo fenómeno se observa en la interfase de dos líquidos

inmiscibles. La tensión superficial (γ) de un líquido se define, en termodinámica, como el trabajo reversible necesario, por unidad de área, para aumentar a temperatura y presión constantes, el área (o la extensión) de la superficie del líquido considerado. Las tensiones superficiales se expresan en unidades de fuerza por unidad de longitud (N/m) (Lehninger, 1978). Considerando las fuerzas a las que están sometidas las moléculas de un líquido se ve que las moléculas situadas en la superficie son atraídas hacia el interior, mientras que en el caso de las moléculas internas, las fuerzas de atracción intermolecular (fuerzas de Van der Waals y de London) se equilibran. Como consecuencia de ello hay que realizar un trabajo para mantener las moléculas en la superficie, adoptando una forma esférica (relación superficie/volumen mínima).

La intensidad de las fuerzas atractivas varía con el disolvente y los solutos presentes, la especie molecular que sea menos atraída hacia el centro de la solución será peor eliminada que las otras de la superficie y se encontrará preferencialmente adsorbida en la interfase. En el equilibrio, la tensión superficial es función de la densidad de las moléculas en la interfase y por lo tanto de la concentración en la disolución. La tensión superficial disminuye a medida que se incrementa la concentración de soluto en la disolución, hasta que se alcanza una meseta correspondiente a la formación de micelas de moléculas tensioactivas, la concentración mínima se llama entonces “Concentración Micelar Crítica” (CMC) (Linden & Lorient, 1994).

Diversos factores intervienen en la aptitud de las proteínas para la adsorción interfacial:

- a. El pH. En soluciones neutras se producen repulsiones electrostáticas débiles (la molécula se adsorbe en forma compacta), a pH alcalino las moléculas se encuentran más plegadas y se produce un incremento en el área de adsorción, pero la capa proteica adherida a la interfase disminuye.
- b. Con los tratamientos térmicos se provoca una desnaturalización previa de las proteínas y se incrementa la velocidad de adsorción.

Las proteínas globulares forman películas interfaciales de mayor espesor y más viscoelásticas, con las moléculas desplegadas se rebaja la tensión superficial y se forman películas poco viscosas. La tensión superficial es una propiedad que influye en

la formación de emulsiones, cuanto más débil sea la tensión más fácilmente se obtiene la emulsión, el papel emulsificante de los agentes tensoactivos se basa precisamente en la capacidad de unirse a la interfase. Las proteínas se encuentran formando una estructura rígida alrededor de las gotitas de agua, las cargas de estas moléculas provocarán repulsiones electrostáticas y se producirá una estabilización de la emulsión. Para la formación de emulsiones se utilizan homogeneizadores cuya eficacia depende de la energía aportada, el sistema de fragmentación de las gotitas y la temperatura.

1.4.6. Aprovechamiento de las propiedades funcionales de las proteínas

Los aislados de proteínas sanguíneas son una fuente muy importante de nutrientes para la alimentación humana, además el conocimiento de su funcionalidad puede ser muy útil para la posible adición como ingrediente proteico en distintas formulaciones alimentarias y nuevos productos.

Las propiedades funcionales de las proteínas, son propiedades físico-químicas que contribuyen a las características deseadas de un alimento. En un mismo alimento intervienen habitualmente varias propiedades al mismo tiempo como se muestra en la Tabla 11.

Algunas de ellas afectan a características sensoriales pero también pueden influir sobre el comportamiento físico del alimento o sobre alguno de sus ingredientes durante la preparación, transformación o almacenamiento. La absorción y retención de agua por los ingredientes proteicos tiene un papel fundamental en la calidad de la textura de diversos alimentos especialmente carnes trituradas y pastas de panadería. La inhibición del agua sin disolución de la proteína conduce a una hinchazón y le confiere consistencia, espesamiento, viscosidad y adherencia.

Tabla 11. Propiedades funcionales que intervienen en diversos alimentos (Cheftel, y cols., 1989)

Alimento	Propiedades
Bebidas	Solubilidad a pH diferentes, estabilidad al calor, viscosidad
Potajes, salsas	Viscosidad, emulsificación, retención de agua
Masa de panadería	Formación de una matriz y de una película que tenga propiedades de viscoelasticidad, cohesión, desnaturalización por el calor, gelificación
Productos de panadería y de pastelería	Absorción de agua, emulsificación, espumado, pardeamiento
Productos lácteos	Emulsificación, retención de materia grasa, viscosidad, espumados, gelificación, coagulación
Reemplazantes del huevo	Espumado, gelificación
Productos cárnicos	Emulsificación, gelificación, cohesión, absorción y retención de agua y de materia grasa
Productos similares a la carne	Absorción, retención de agua y de materia grasa, firmeza, masticabilidad, cohesión, desnaturalización por el calor
Recubrimientos alimenticios	Cohesión, adhesión
Productos de confitería y chocolatería	Dispersabilidad, emulsificación

Muchos productos alimenticios son emulsiones (leche, cremas, helados, mantequilla, mayonesa, etc.), en las que los constituyentes proteicos ejercen un papel estabilizador de esos sistemas coloidales. La capacidad espumante de algunas proteínas es muy apreciada en la elaboración de productos de confitería, la proteína espumante por excelencia es la ovoalbúmina pero también poseen buenas propiedades espumantes la globina, hemoglobina y la BSA por lo que pueden ser utilizados como aditivos alimentarios que se emplearían como agentes espumantes.

1.5. SÍNTESIS DE MATERIALES. GELES PROTEICOS SANGUÍNEOS

Otra de las propiedades funcionales que presentan las proteínas alimentarias es la capacidad gelificante. Aprovechando esta propiedad es posible elaborar geles a partir de las proteínas sanguíneas.

Los geles son sistemas dispersos de al menos dos componentes en los que la fase dispersa forma un entramado cohesivo en el medio de dispersión. Se caracterizan por la falta de fluidez y la deformabilidad elástica. Ocupan una posición intermedia entre las disoluciones, en las que predominan las fuerzas repulsivas entre las moléculas de la fase dispersa, y los precipitados, en los que dominan las interacciones intermoleculares fuertes. Se diferencian dos tipos de geles, entre los que no obstante existen transiciones, las redes poliméricas y las dispersiones agregadas (Belitz&Grosch, 1997).

1.5.1. Las redes poliméricas

Las redes poliméricas son geles formados por gelatina, polisacáridos como la agarosa o los carragenanos y alcoholes como el glicerol. La formación de una red tridimensional tiene lugar por agregación de moléculas fibrilares desorganizadas a estructuras limitadas ordenadas. Es característico de los geles de este tipo la baja concentración de polímero (~ 1%) y la transparencia y la textura fina. La formación del gel se impide utilizando un determinado pH, por adición de determinados iones, o por calentamiento o enfriamiento. Puesto que la agregación se produce principalmente por puentes de hidrógeno, que se rompen fácilmente al calentar, las redes poliméricas son termorreversibles, es decir, los geles se forman por enfriamiento de una disolución y al calentar se vuelven a fundir.

1.5.2. Las dispersiones agregadas

Las dispersiones agregadas son geles formados a partir de proteínas globulares tras su calentamiento y desnaturalización. El plegamiento térmico de las proteínas conduce a una liberación de las cadenas laterales aminoacídicas, que podrán participar así en interacciones intermoleculares. La asociación subsiguiente ocurre con formación

de pequeños agregados esféricos, que aparecen en cadenas cuyas interacciones dan lugar a la red del gel. Para que este tipo de agregación desordenada conduzca a la formación de un gel, se necesitan concentraciones proteicas relativamente altas (5-10%). También la velocidad de agregación debe ser menor que la de plegamiento, porque en caso contrario, en el entorno del punto isoeléctrico por ejemplo, se formarían geles poco estructurados. El grado de desnaturalización necesario para que comience la agregación parece depender de la proteína. Puesto que lo que se liberan durante la desnaturalización parcial son sobre todo grupos hidrófobos, predominan las interacciones hidrófobas intermoleculares, de ahí el carácter termoplástico (termoirreversible) de este tipo de geles, en contraposición con los geles termorreversibles estabilizados por puentes de hidrógeno. Los geles termoplásticos no se fluidifican por calentamiento, aunque se pueden ablandar o arrugar. Además de las interacciones hidrófobas, los puentes disulfuro formados a partir de los grupos tiol liberados contribuyen también a la red, del mismo modo que los enlaces iónicos intermoleculares entre proteínas con puntos isoeléctricos distintos en sistemas heterogéneos.

La capacidad de formación de un gel se mejora mediante la adición de sal: el incremento moderado de la fuerza iónica aumenta la interacción entre las moléculas cargadas o los agregados moleculares por protección de carga, sin que se llegue a la precipitación. Un ejemplo de ello lo encontramos en la formación del queso a partir de la leche.

1.6. LA REOLOGÍA

Para conocer las utilidades potenciales de los geles elaborados a partir de proteínas sanguíneas es necesario hacer uso de la reología, ya que esta ciencia permite comprender el comportamiento de los fluidos alimentarios.

Se denomina reología, palabra introducida por Eugen Bingham en 1929, al estudio de la deformación y el fluir de la materia. Una definición más moderna expresa que la reología es la parte de la física que estudia la relación entre el esfuerzo y la deformación en los materiales que son capaces de fluir.

1.6.1. Los fluidos alimentarios según su comportamiento reológico

Según su comportamiento reológico los fluidos pueden clasificarse tal y como se indica en la Figura 4.

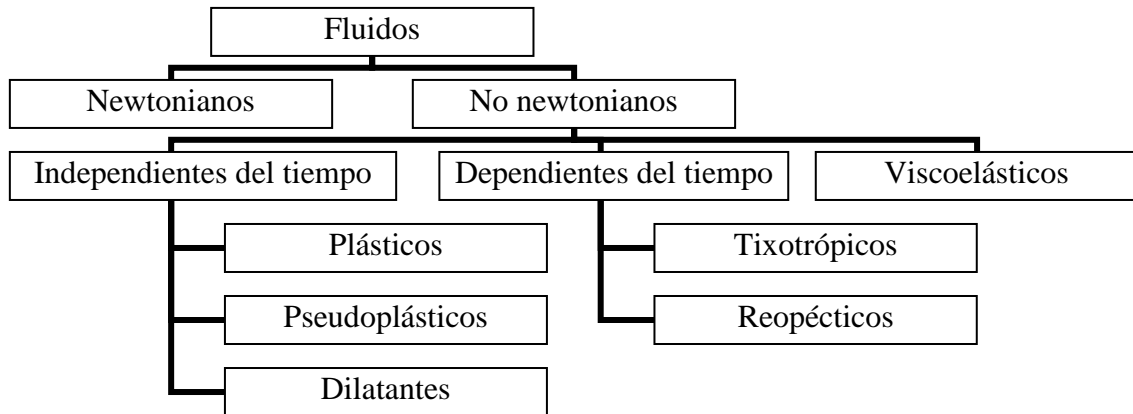


Fig. 4. Tipos de fluidos en función de su comportamiento reológico. (Steffe, 1996)

1.6.1.1. Fluidos newtonianos

Son aquellos cuya viscosidad puede considerarse constante en el tiempo. Se trata de fluidos que no poseen propiedades elásticas, son incompresibles e isotrópicos. Muchos líquidos como la leche, muchos aceites, ciertas mieles (Brummer, 2006) muestran un comportamiento newtoniano en un rango amplio de condiciones de análisis. Así, el comportamiento reológico de los fluidos newtonianos sigue la ley de Newton de la viscosidad, que indica que cuando un fluido es sometido a un esfuerzo cortante este esfuerzo es directamente proporcional a la deformación del fluido. En este tipo de fluidos la viscosidad únicamente depende de la temperatura y la composición (Rao, 1999).

1.6.1.2. Fluidos no newtonianos

Son aquellos cuya viscosidad varía con la temperatura y la tensión cortante que se les aplica. Como resultado, los fluidos no newtonianos no tienen un valor de viscosidad

definido y constante, sino que este depende de la temperatura, de la composición y, a veces, del tiempo de aplicación del esfuerzo. Es por esto que los fluidos no newtonianos pueden a su vez clasificarse en fluidos con comportamiento reológico independiente del tiempo o fluidos con comportamiento reológico dependiente del tiempo.

a. Fluidos con comportamiento reológico independiente del tiempo

Se caracterizan porque la viscosidad aparente sólo depende de la temperatura, de la composición del fluido y del esfuerzo cortante aplicado; pero nunca del tiempo de aplicación de este último. A su vez, se clasifican en tres grupos:

a.1. Fluidos pseudoplásticos

Se caracterizan porque su viscosidad aparente decrece cuando aumenta el esfuerzo cortante. El comportamiento pseudoplástico es quizás el más frecuente de los fluidos alimentarios. Lo presentan la mayoría de los derivados de frutas y vegetales, los componentes fundamentales del huevo y muchos productos lácteos (Steffe, 1996).

a.2. Fluidos dilatantes

Se caracterizan porque al aumentar el esfuerzo cortante aumenta su viscosidad aparente. Existen pocos alimentos que presenten este comportamiento, entre ellos se encuentran las disoluciones de almidón (Brummer, 2006).

a.3. Fluidos plásticos

En ellos la viscosidad aparente decrece cuando aumenta el esfuerzo cortante, pero en este caso no fluyen hasta que no son sometidos a un esfuerzo cortante límite determinado, denominado esfuerzo umbral o límite de fluencia. Ejemplos de estos fluidos son el tomate, el chocolate, la mostaza o la mayonesa (Steffe, 1996).

b. Fluidos con comportamiento reológico dependientes del tiempo

Son aquellos en los que la viscosidad aparente depende, además del esfuerzo cortante, del tiempo de actuación de dicho esfuerzo. Los fluidos no newtonianos con propiedades dependientes del tiempo se subdividen en tixotrópicos y reopéticos.

b.1. Fluidos tixotrópicos

Son todos aquellos que al aplicarles un esfuerzo cortante constante muestran una disminución de la viscosidad aparente con el tiempo. El comportamiento tixotrópico ha sido descrito en varios alimentos como la mayonesa, la mostaza o los helados. (Brummer, 2006).

b.2. Fluidos reopéticos

Son aquellos que presentan un comportamiento contrario a los anteriores, es decir, al aplicarles un esfuerzo cortante constante su viscosidad aparente aumenta con el tiempo. La reopexia es una propiedad poco frecuente en el campo de la alimentación.

c. Fluidos viscoelásticos

Algunos materiales únicamente se deforman cuando se les aplica una fuerza sobre ellos (comportamiento elástico), mientras otros fluyen (comportamiento viscoso). Sin embargo, para otros materiales la respuesta es menos clara ya que se deforman y también fluyen al aplicarles una fuerza, su respuesta es parcialmente elástica y parcialmente viscosa. Este comportamiento se denomina viscoelástico.

Existen muchos alimentos que presentan propiedades viscoelásticas. Se trata de productos con características como los geles, helados, mantequilla o yogures (Steffe, 1996). El comportamiento viscoelástico se estudia mediante los ensayos dinámicos u oscilatorios (Rao, 1999). En ellos la muestra es sometida a una deformación (γ) que se aplica de modo sinusoidal con una determinada frecuencia (ω) cumpliéndose la siguiente ecuación en función del tiempo (t):

$$\gamma(t) = \gamma_o \text{sen}(\omega t) \quad (3)$$

dónde γ_o es la amplitud de la deformación. La deformación aplicada genera dos componentes del esfuerzo (τ) en el material viscoelástico, un componente elástico o módulo de almacenamiento (G') en fase con la deformación y otro viscoso o módulo de pérdida (G'') 90° en desfase con la deformación. De la ecuación (3) puede obtenerse la

(4) que muestra que la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) para evaluar el componente viscoso debe estar $\pi/2$ rad en desfase con la deformación.

$$\dot{\gamma}(t) = \gamma_o \omega \text{sen}(\omega t) \quad (4)$$

De esta manera para la deformación en el rango viscoelástico lineal, el esfuerzo generado (τ_0) puede expresarse en función de los módulos elástico y viscoso de la siguiente manera:

$$\tau_0 = G' \gamma_0 \text{sen}(\omega t) + G'' \gamma_0 \text{cos}(\omega t) \quad (5)$$

Para un material viscoelástico el esfuerzo generado es también sinusoidal, pero muestra un ángulo de desfase de δ rad cuando se compara con la deformación. La siguiente ecuación expresa la variación sinusoidal del esfuerzo resultante:

$$\tau(t) = \tau_0 \text{sen}(\omega t + \delta) \quad (6)$$

De las ecuaciones anteriores pueden obtenerse las siguientes expresiones que explican el comportamiento viscoelástico:

$$G' = \left[\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right] \text{cos} \delta \quad (7)$$

$$G'' = \left[\frac{\tau_0}{\gamma_0} \right] \text{sin} \delta \quad (8)$$

$$\text{Tan} \delta = \frac{G''}{G'} \quad (9)$$

dónde $\text{tan} \delta$ es la tangente de las pérdidas. El módulo G' representa la cantidad de energía que es almacenada en el material o recuperable por ciclo de deformación, mientras que el módulo G'' representa la cantidad de energía que se disipa por ciclo de deformación. Por tanto, para un sólido elástico perfecto toda la energía es almacenada, G' es cero y el esfuerzo y la deformación estarán en fase ($\delta = 0^\circ$). Por el contrario para un líquido sin propiedades elásticas toda la energía se disipa en forma de calor, G' es cero y el esfuerzo y la deformación estarán 90° en desfase ($\delta = 90^\circ$).

Para un determinado material las magnitudes de G' y G'' están influenciadas por la frecuencia, la temperatura y la deformación. Para valores de deformación en el rango lineal G' y G'' son independientes de la deformación. La relación entre los módulos G' y G'' también puede ser expresada en función de un módulo complejo (G^*) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (10)$$

1.6.2. Modelización del comportamiento reológico de los alimentos

El comportamiento reológico de un fluido alimentario puede describirse según distintas ecuaciones que relacionan el esfuerzo constante con la velocidad de deformación (Rao, 1999).

El modelo de un fluido Newtoniano se describe mediante la siguiente ecuación (Rao, 1999):

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad (11)$$

El esfuerzo cortante, τ (Pa), es directamente proporcional a la velocidad de deformación del fluido $\dot{\gamma}$ (s^{-1}), y la viscosidad, μ (Pa.s) es la constante de proporcionalidad. Sin embargo, los fluidos no newtonianos requieren de más de un parámetro para caracterizar su comportamiento. De este modo, el flujo de los materiales pseudoplásticos y dilatantes puede ser explicado mediante la Ley de la Potencia (Steffe, 1996):

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (12)$$

dónde K (Pa.s) es el índice de consistencia y el exponente n (adimensional) es el índice de comportamiento que refleja la proximidad del comportamiento del material al flujo newtoniano. Así para el caso concreto de un fluido Newtoniano ($n = 1$), el índice de consistencia K es idénticamente igual a la viscosidad del fluido, mientras que cuando $n < 1$ el fluido es pseudoplástico y cuando $n > 1$ es dilatante.

La ley de la Potencia ha sido ampliamente utilizada para caracterizar el comportamiento pseudoplástico y dilatante de los fluidos alimentarios, sin embargo, cuando los materiales presentan un comportamiento plástico, es decir, poseen un límite de fluencia o esfuerzo umbral, τ_0 (Pa), este parámetro puede ser incluido en la Ley de la Potencia, transformándose así en el modelo de Herschel- Bulkley que se expresa como sigue (Rao, 1999):

$$\tau = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n \quad (13)$$

El modelo de Carreau también se utiliza para estudiar el comportamiento de este tipo de fluidos:

$$\mu_a = \frac{\mu_0}{\left[1 + \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_c}\right)^2\right]^s} \quad (14)$$

dónde μ_a (Pa.s) es la viscosidad aparente, μ_0 (Pa.s) es la viscosidad limitante para la región Newtoniana, $\dot{\gamma}_c$ (s^{-1}) es la velocidad de deformación crítica en el momento en que el comportamiento se hace pseudoplástico y el exponente s (adimensional) es un parámetro relacionado con la pendiente de la curva en ese punto (Steffe, 1996).

La reología es, por tanto, un instrumento necesario para caracterizar los geles elaborados a partir de las proteínas sanguíneas, ya que nos aporta información sobre la estructura interna de los geles, el efecto de la temperatura sobre los mismos o cómo se comportarán al aplicarles un esfuerzo cortante. Del mismo modo se ha comprobado que la estabilidad reológica es considerada un importante parámetro de calidad (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas, 2005).

CAPÍTULO 2:
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. PROCESADO DE RESIDUOS ALIMENTICIOS CON CONTENIDO PROTEICO

2.1.1. Procesado de la sangre

2.1.1.1. Obtención de la sangre

La sangre y sus fracciones son fluidos muy complejos con una gran diversidad de compuestos. Por eso todas las operaciones de manipulación de la sangre se deben realizar en el menor espacio de tiempo posible a partir de su recogida, para evitar su deterioro.

La sangre empleada en este trabajo ha sido de procedencia bovina y porcina proveniente del Matadero Central de Asturias Junquera-Bobes (Noreña) y se mantuvo siguiendo unas determinadas pautas higiénicas. Es muy importante la recogida higiénica de la sangre con el fin de evitar la contaminación microbiana, que por un lado biodegrada la sangre y sus fracciones hidrolizando las proteínas que se pretenden obtener íntegras, y por otro limitaría sus usos. Es necesaria una pulcritud y escurpulosidad por parte de los operarios encargados del sangrado del animal. Por tanto, la limpieza de la indumentaria, utillaje y personal es muy importante y no debe ser motivo de retrasos en la cadena de matanza. La sangre se recoge en recipientes de plástico de unos 5 litros para evitar cambios bruscos de temperatura y, a continuación se reparte en 5 recipientes de cristal de 1 litro con 50 mL de citrato de sodio saturado (Panreac) en cada uno. Los anticoagulantes son sustancias que tienen el mismo objetivo, evitar la formación de los coágulos de fibrina, pero actúan en virtud de diversos mecanismos de acción (Ockerman y cols., 1994). Hay sustancias que eliminan los iones de calcio del medio convirtiéndolos en formas no ionizadas, como el citrato de sodio. En esta memoria se utilizó el citrato sódico al 1%, el cual se puso en contacto con la sangre al trasvasar esta (desde el recipiente de plástico en el que se había recogido previamente) a las botellas de cristal que contenían al anticoagulante y se agitó con cuidado para evitar la hemólisis. Posteriormente la mezcla sangre-anticoagulante es llevada al laboratorio en aproximadamente 15 minutos y mantenida a temperatura de refrigeración (4 °C).

2.1.1.2. Métodos de separación de la sangre

a. *Fraccionamiento de la sangre*

Para obtener las diferentes proteínas que hay en la sangre se llevó a cabo la separación de las dos fases que la componen (Fig. 5), la fracción celular y el plasma, mediante centrifugación. Las condiciones idóneas para separar íntegramente plasma y células fueron 10000xg durante 10 minutos a 4-10 °C, utilizando para ello una centrífuga Kubota 6700 (Moure, 2000).

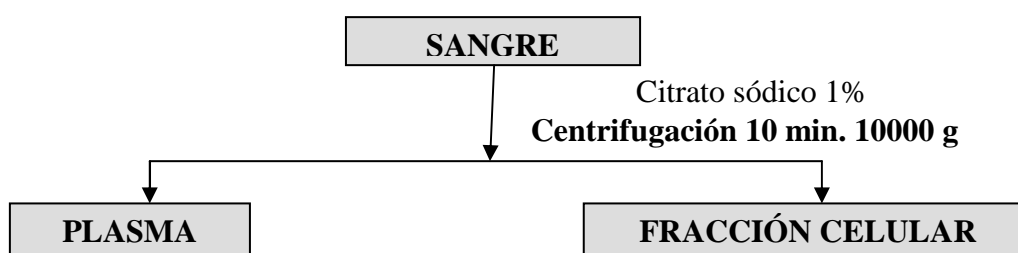


Fig. 5. Esquema de la obtención de los componentes de la sangre.

Posteriormente el plasma se sometió a otra centrifugación a 10000xg en una centrífuga Kubota 6700, durante 10 minutos y a 4 °C, para retirar la fracción de grasa que puede llegar a suponer un 3 % del total de los lípidos presentes en la sangre y que tiene efectos negativos para el aprovechamiento de esas proteínas. A continuación el plasma y la fracción lipídica se separaron por decantación (Prandl y cols., 1994).

b. *Fraccionamiento del plasma*

Para la separación de las proteínas procedentes del plasma sanguíneo se recurrió a una modificación de la técnica de Cohn (Cohn, 1948), que consiste en la adición de etanol a diferentes concentraciones. En la Figura 6 se muestra el diagrama de flujo del proceso. En todo momento se mantuvo una temperatura cercana a los 0 °C mediante la colocación de la muestra en un baño de hielo. La adición de etanol se realizó muy lentamente (gota y gota) y en constante agitación para no crear concentraciones locales

de etanol elevadas y así evitar la precipitación de las proteínas pertenecientes a fracciones posteriores.

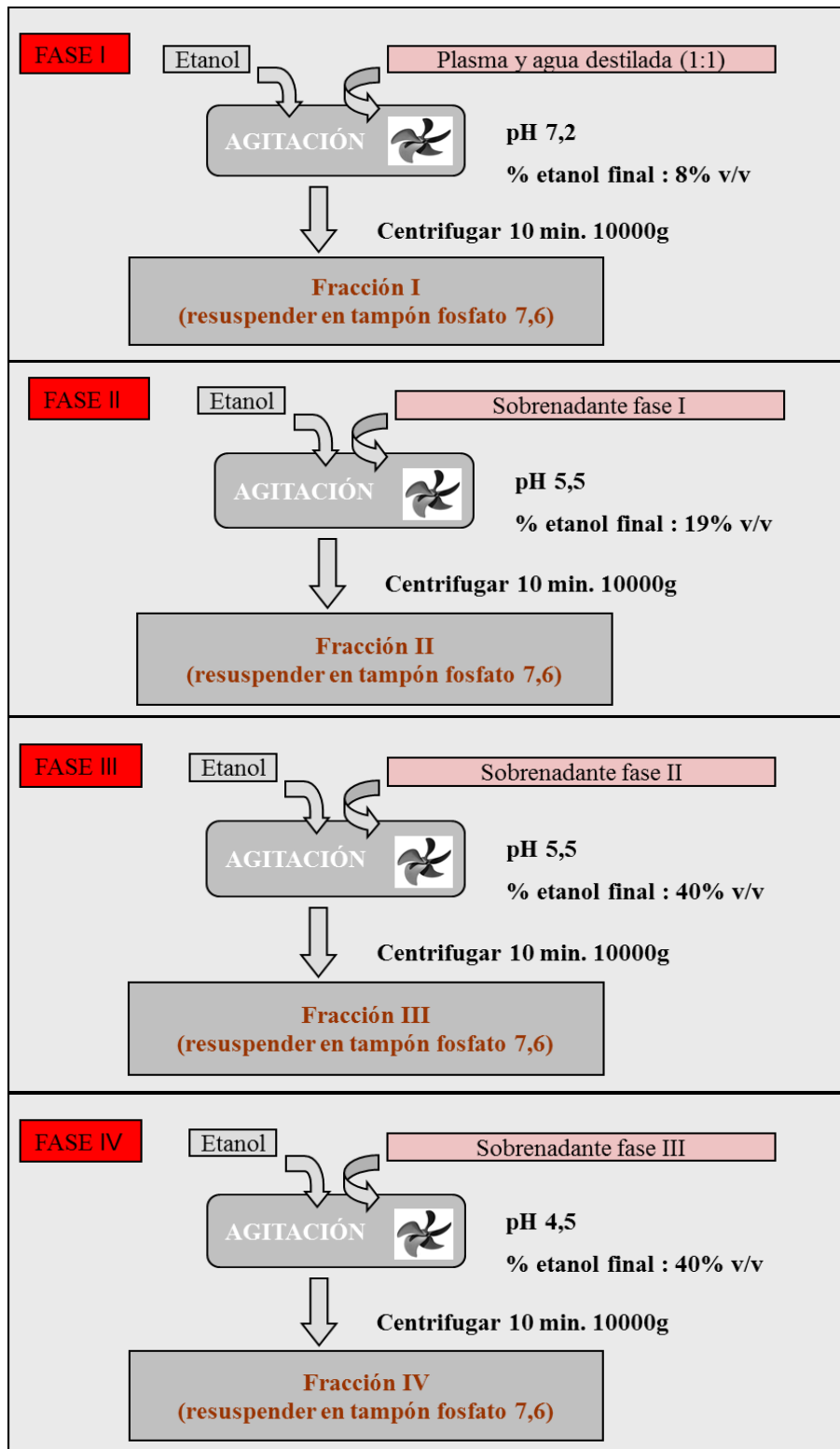


Fig. 6. Diagrama de flujo del fraccionamiento de las proteínas plasmáticas.

c. Separación de proteínas celulares

La fracción celular de la sangre está formada principalmente por glóbulos rojos, elementos formados por una membrana plasmática que contienen en su interior la hemoglobina.

c.1. Hemólisis celular

Para extraer la hemoglobina se llevó a cabo la ruptura de los hematíes por medio de choque osmótico. Esto se consiguió agregando un volumen equivalente de agua destilada a la fracción celular, con lo que se logró la formación de poros en la membrana plasmática que permitieron la salida de la hemoglobina al exterior. Durante este proceso se mantuvo la mezcla en una suave agitación. La siguiente fase fue la eliminación de las membranas plasmáticas. Para ello se agregó un solvente orgánico (cloroformo, Panreac) a la mezcla en proporción 1:4 v/v (cloroformo/disolución total). El cloroformo no es miscible en agua y es capaz de arrastrar las membranas plasmáticas y así separarlas de la hemoglobina disuelta en agua. La mezcla se dejó reposar unos minutos y a continuación se centrifugó en una centrífuga Kubota 6700 durante 10 minutos con una fuerza de 10000xg. Al final del proceso se obtuvo un sobrenadante formado por agua y hemoglobina disuelta y un precipitado formado por cloroformo emulsionado con las membranas plasmáticas.

c.2. Precipitación y decoloración del contenido proteico

Se cargó en el tanque de agitación una disolución que contenía el 90 % de etanol (Panreac) como agente precipitante y el resto de peróxido de hidrógeno (Panreac) de 100 volúmenes como agente decolorante, sobre la cual se fue añadiendo la disolución de hemoglobina. La adición se realizó lentamente y agitando constantemente para así permitir la correcta homogeneización de los grandes sólidos formados. La proporción de la disolución de hemoglobina respecto a la de etanol-peróxido fue de 1:3 v/v. Una vez finalizada la adición se dejó equilibrar el proceso durante unos 30 minutos. A continuación, se realizó una filtración para separar las dos fases. El líquido sobrenadante se desechó ya que estaba compuesto por etanol con el grupo hemo y parte del peróxido utilizado. Para eliminar el exceso de disolvente del precipitado se realizaron dos ciclos de lavado con aproximadamente 10 veces el volumen de precipitado y, a continuación, se llevó a cabo una eliminación enzimática del exceso de peróxido de hidrógeno con

catalasa (Panreac). Este enzima se añadió en disolución para alcanzar una concentración final en el precipitado de 0.25% en peso y se dejó actuar media hora. Finalmente, se dejó secando a temperatura ambiente (Fig. 7).

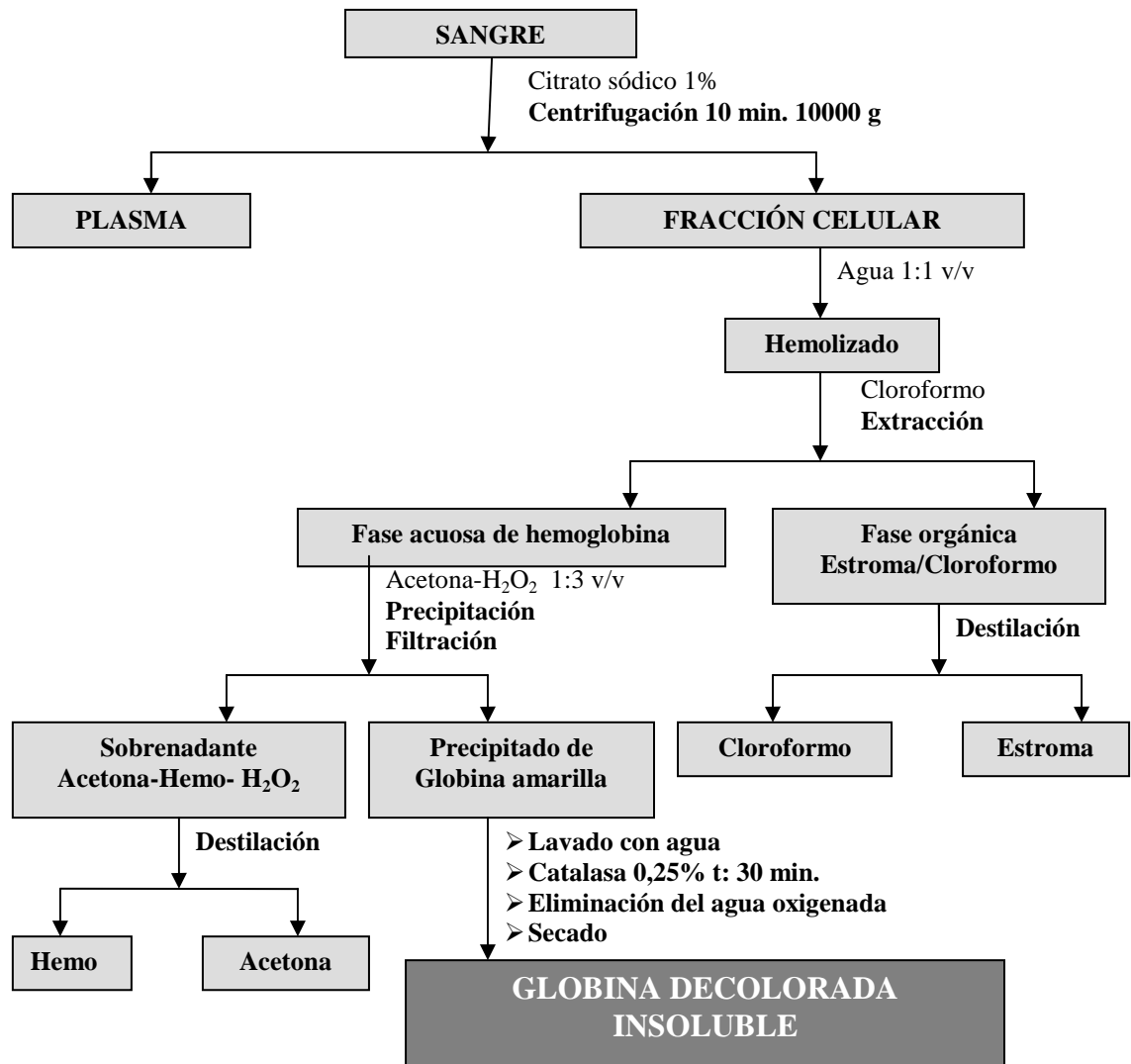


Fig. 7. Diagrama de flujo de la obtención de globina decolorada.

2.2. PROCESOS DE DESMINERALIZACIÓN DEL PLASMA

2.2.1. Desmineralización por intercambio iónico

2.2.1.1. Intercambio catiónico

Para llevar a cabo la eliminación de los cationes del plasma se utilizó la resina catiónica fuerte Lewatit S-100 (Lanxess Chemicals), cuyas características se muestran en la Tabla 12.

Para determinar la capacidad de retención de la resina se añadieron 30 mL de plasma sanguíneo sin tratar a 1 g de resina (L/S = 30). Se tomaron muestras a diferentes tiempos entre 0 y 60 minutos, lo que permitió obtener la cinética del proceso, es decir, la variación de la concentración de iones del plasma (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) con el tiempo. El contacto se llevó a cabo en un tanque agitado de 100 mL de volumen.

Tabla 12. Características de las resinas (a) Lewatit S-100, (b) Lewatit MP-62 y (c) Lewatit MP-500

	(a)	(b)	(c)
Tipo	Na Catiónica	Aniónica	Cl ⁻ Aniónica
Color	Ambar	Beige	Beige/opaca
Matriz básica	Poliestireno	Poliestireno reticulado	Poliestireno entrecruzado
Grupos activos	Sulfónica	Amina terciaria	Amina cuaternaria tipo 1
Granulometría(mm)	0.3-1.25	0.32-1.25	0.47(±0.06)
Densidad aparente (kg/m³)	800-900	670	1060
Humedad (weight %)	42-45	50-55	62
Capacidad total (mol /L)	2.2	1.7	2
Capacidad útil (mol /L)	1.6	1.23	1.4
Estabilidad termal (°C)	-10 a 120	-20 a 100	-20 a 100
pH estabilidad	1-14	0-14	0-14

Posteriormente se realizaron las curvas de ruptura de los tres cationes mayoritarios del plasma. Para lo cual se utilizó una columna de vidrio de borosilicato (Amicon, Millipore, modelo G32x250) de 32 mm de diámetro y una altura de lecho de 120 mm, ayudada de una bomba peristáltica (Masterflex, modelo 7554-60) provista de tubos de silicona (modelo 96400-16) que impulsaba la alimentación en sentido ascendente. Durante el experimento se bombearon 400 mL de plasma a través de la columna a un flujo medio de 2.5 mL /min, tomando muestra cada 5 minutos durante 3.5 horas. A continuación, se llevó a cabo un lavado con agua destilada para eliminar el plasma retenido en los poros de la columna y determinar la porosidad del lecho. Se recogieron 2 fracciones del agua de lavado: una de 100 mL, y la otra de 500 mL. La regeneración de la columna fue realizada con HCl 1N (Merck), durante 35 minutos, tomando muestra cada 5 minutos y manteniendo el mismo flujo medio que en el periodo

de carga, pero en este caso la solución de regeneración fue impulsada en sentido descendente (Fig. 8).



Fig. 8. Columna de vidrio de borosilicato cargada con resina catiónica Lewatit S-100 preparada para la fase de elución.

Para cada muestra, tanto en el periodo de carga como en el de elución, se determinó: el pH, la concentración de los cationes mayoritarios del plasma (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) y la concentración de proteína.

2.2.1.2. Intercambio aniónico

Para llevar a cabo la eliminación de los aniones del plasma sanguíneo se han utilizado 2 resinas aniónicas básicas fuertes Lewatit MP-62 Y MP-500, ambas manufacturadas por Lanxess Chemicals, cuyas características se mostraron en la Tabla 12. En ambos casos, 50 mL de plasma sanguíneo sin tratar fueron añadidos a 1 g de resina ($L/S = 50$) en tanques agitados de 100 mL de volumen, tomando muestra a

diferentes tiempos entre 0 y 60 minutos. Este tiempo fue suficiente para alcanzar el equilibrio. Para ambas resinas se realizaron varias pruebas utilizando proporciones L/S de 10, 16.5 y 25 mL dlon/ gramos de resina con el objeto de determinar la capacidad de cada resina y escoger la más adecuada para llevar a cabo los experimentos en columna.

Para estudiar la operación de desmineralización, se hicieron medidas de los aniones mayoritarios del plasma, en este caso Cl^- y SO_4^{2-} , y se obtuvieron las respectivas curvas de ruptura. Se utilizó la misma columna de vidrio de borosilicato (Amicon, Millipore, modelo G32x250), ajustada a una altura de lecho de 60 mm, y la misma bomba peristáltica que en el intercambio catiónico. Durante el experimento se bombearon 60 mm de plasma sanguíneo a un flujo medio de 1.5 mL /min en sentido ascendente, tomando muestras cada 2 minutos. Una vez finalizado el periodo de carga, la columna fue lavada con 125 mL de agua destilada, 25 mL en un primer paso y 100 mL en el segundo. Finalmente, la regeneración fue realizada con NaOH 0.5N durante 35 minutos al mismo flujo que en el periodo de carga, pero en sentido descendente. Las muestras fueron tomadas igualmente cada 2 minutos.

Para cada muestra, tanto en el periodo de carga como en el de elución, se determinó: el pH, la concentración de F^- , Cl^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} y la concentración de proteína.

2.2.2. Desmineralización por ultrafiltración

Otro proceso de desmineralización se llevó a cabo usando una membrana de ultrafiltración Labscale TFF system (Millipore). Este sistema modular incluye un reservorio acrílico de 500 mL, un agitador magnético integral y una bomba (Figura 9).

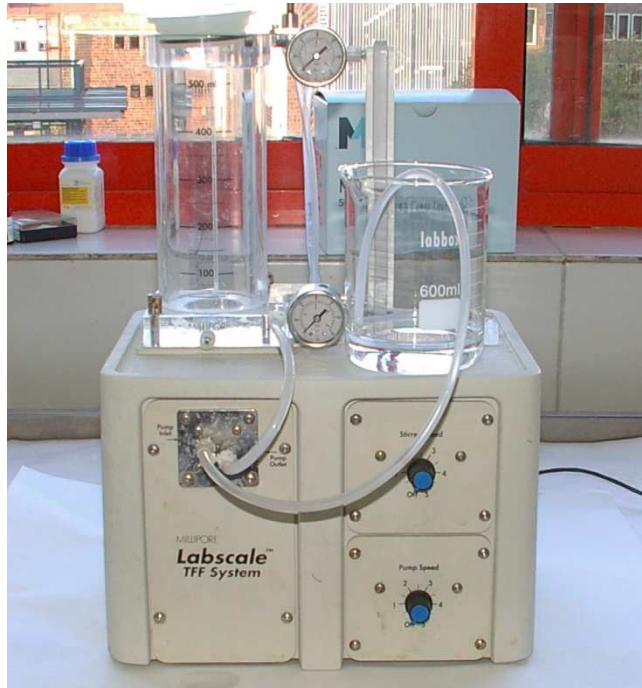


Fig. 9. Equipo de ultrafiltración Labscale TFF System.

El diseño de este sistema permite que el dispositivo Millipore Pellicon XL se intercale directamente en un lado del reservorio. El aparato Pellicon XL contiene membranas con un área de filtración efectiva de 0.005 m^2 . Teniendo en cuenta que las principales proteínas plasmáticas presentan un peso molecular mayor de 30 KDa, se ha escogido un tamaño medio de poro de 10 KDa, para permitir la filtración de iones inorgánicos (solución de permeado) reteniendo las proteínas en el retenido (Wan y cols, 2002; Kozinski & Lightfoot, 2002; Martinache y cols, 1988; De Vouno y cols., 1975). Las especificaciones para el dispositivo Pellicon XL se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Especificaciones para el dispositivo Pellicon XL

Materiales de construcción	
Membrana de Biomax	Poliéter sulfuro
Membrana de Ultracel	Celulosa regenerada
Pantallas, cubiertas, conectores, tapas.	Polipropileno
Conectores	Adaptador femenino
Área de filtración cm ² (ft ²)	50
Anchura, cm (in.)	3 (1.2)
Longitud, cm (in.)	18.8 (7.4)
Volumen de retraso (típico), mL	3.2
Máxima presión de entrada, bar (psi)	5.5 (80) a 50 °C
Máxima presión transmembrana, bar (psig)	2.8 (40)
Tasa de recirculación, L/min	0.03-0.05
Membrana de Biomax	1-14
Membrana de Ultracel	2-12

Para llevar a cabo la desmineralización se realizó la filtración de plasma usando un circuito de retroalimentación. El proceso de filtración fue mantenido hasta que el flujo era muy bajo. Los parámetros determinados, para el permeado y para el retenido, fueron el pH, la concentración de proteína y la concentración de cationes y de aniones. Tras la operación, las membranas se lavaron usando 500 mL de NaOH 1N, fijando la presión de trabajo de la bomba a 30 psi. Posteriormente, se bombearon 500 mL de agua destilada a través de la membrana.

2.3. DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN

2.3.1. Análisis de la desnaturalización sufrida por las proteínas del plasma sanguíneo

La evaluación de la desnaturalización sufrida por las proteínas del plasma sanguíneo se llevó a cabo mediante viscosimetría. Se determinó el valor de la viscosidad de muestras de plasma sanguíneo sometidas a intercambio iónico y ultrafiltración. Para ello se empleó un viscosímetro rotacional Brookfield DV-III. El principio de medida se basa en aplicar una velocidad de giro constante y medir la resistencia (par de torsión) que ofrece la muestra al giro del rotor. Dispone además de un baño térmico que permite la medida de la viscosidad a varias temperaturas y de varios juegos de rotores. Las condiciones de temperatura y velocidad de giro se mantuvieron constantes todo el experimento (25 °C y 250 rpm).

2.3.2. Renaturalización de lisozima

Para evaluar la renaturalización de proteínas que han sufrido un proceso de desnaturalización se ha utilizado la lisozima porque, a diferencia del plasma sanguíneo, es una proteína con actividad enzimática. Todo ello fue realizado en vasos de precipitados preparándose volúmenes de 50 mL.

Para llevar a cabo la renaturalización de la lisozima de clara de huevo (Sigma), esta fue previamente disuelta en un tampón de desnaturalización constituido por una disolución 0.05 mol/l Tris – HCl a pH 8.7, conteniendo 8 mol/L de urea y 0.1 mol/L de ditioneitol (DTT, Sigma). Tras la incubación durante 4-5 horas a temperatura ambiente, se analizó la actividad enzimática para confirmar si la proteína había sido desnaturalizada completamente (Li y cols., 2002).

El análisis de la actividad enzimática fue determinado por el método de Jolles (Jolles, 1962). Para ello, la absorbancia a 450 nm de *Micrococcus lysodeikticus* (BCCM/LMG Bacteria collection) suspendidos en 0.06 mol/L de fosfato potásico (pH 6.2) fue ajustada a 0.7. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los

microorganismos fue Nutrient Broth. Tras la adición de 10-20 μ l de la solución de lisozima desnaturalizada, se midió el descenso en la absorbancia a 450 nm.

A continuación, se llevó a cabo la dilución de la solución de lisozima desnaturalizada en un tampón de renaturalización controlando que la concentración de la proteína fuese baja para evitar la formación de agregados. El tampón de refolding esta constituido por 0.1 mol/l Tris – HCl a pH 8.7, conteniendo 2 mol/l de urea, 3 mmol/l de glutatona reducida (GSH, Sigma), 0.3 mmol/l GSSG y 0.15 mol/l NaCl.

2.4. PROPIEDADES FUNCIONALES

2.4.1. Determinación de la solubilidad

La solubilidad proteica de las muestras se determinó siguiendo el método de Vouno (De Vouno y cols, 1975). Se cogieron 0.5 gramos de cada una de cada una de las proteínas analizadas y se disolvieron en 10 mL de agua ajustada a distintos pH de 3 a 8 añadiendo para ello HCl 1N ó NaOH 1N. Se agitó la disolución durante 30 minutos a 6000 rpm en una centrífuga, Kubota Modelo 6700. La cantidad de proteína soluble se determinó usando el método de Lowry, se midió la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-vis modelo 1203 y se expresó como un porcentaje de la originalmente puesta en la disolución.

2.4.2. Determinación de las propiedades emulsificantes

La capacidad emulsificante se determinó basándose en la técnica de Inklar y Fortuin (Inklar & Fortuin, 1969). Se disolvieron distintas concentraciones de proteína desde 20 hasta 100 mg de proteína en 10 mL de una disolución de NaCl al 0.075%. El NaCl aumenta la capacidad emulsificante de las proteínas al provocar un desdoblamiento de la red proteica. La mezcla se agitó durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 3000xg (centrífuga Kubota Modelo 6700) durante 10 minutos. El aceite no emulsificado se separó y se calculó el porcentaje de emulsificación de la siguiente manera:

$$\% E = \frac{ve}{va} * 100 \quad (17)$$

dónde: E= % de emulsificación

Ve= volumen (mL) de aceite emulsificado

Va= volumen (mL) de aceite añadido

2.4.3. Determinación de las propiedades espumantes

La capacidad espumante se evaluó usando la técnica de Baldwin (Baldwin & Sinthavalai, 1974). Para ello se disolvieron 0.17 gramos de proteína en 10 mL de agua, concentración a la cual se forman los mayores volúmenes de espuma según Tybor (Tybor y cols., 2001), ajustada a distintos valores de pH de 2 a 10. La espuma se formó agitando la dispersión a 1000xg (agitador Selecta X-1000) durante 10 minutos. El volumen específico de espuma se mide experimentalmente en una probeta y la estabilidad de la espuma se determina midiendo la disminución en el volumen de espuma con el tiempo a los 5, 10 y 15 minutos.

2.4.4. Determinación de la tensión superficial

Se empleó un tensiómetro modelo Krüss K8. El método de medida consistió en sumergir en un líquido un anillo que se encuentra conectado a la varilla de una balanza. Una vez sumergido se retira lentamente y se mide la fuerza necesaria para retirar el anillo en contra de la tensión superficial. La tensión superficial se define por la fuerza “K” por medio de la cual la superficie del líquido actúa sobre una línea recta de longitud “l”.

$$\sigma = \frac{K}{l} \quad (18)$$

dónde σ = energía específica de superficie

l = longitud

K = fuerza

Según la geometría del anillo y de acuerdo a la ecuación (18), la tensión superficial se expresa por la ecuación:

$$\sigma = \frac{K}{4\pi r} \quad (19)$$

dónde r = valor medio de los diámetros externo e interno

La tensión superficial se expresa en mN/m.

El equipo consta de:

- Alambre de torsión atrapado entre dos abrazaderas
- Tornillo sin fin posterior que ajusta el tensiómetro
- Tornillo sin fin anterior que está conectado a una escala iluminada con nonius
- Balanza cuyo eje está fijado al alambre formando un ángulo de 90°
- Anillo completamente plano en su parte inferior
- Sistema óptico que detecta el movimiento vertical del eje de la balanza
- Recipientes con el líquido de medida
- Meseta que se mueve verticalmente sobre una guía
- Termostato

Metodología de medida:

El anillo se lava con acetona y se flamea previamente a cada medida, colocándose a continuación en la balanza (previamente cerrada). Se deposita el contenedor de la muestra sobre la mesita termostatizada y esta se eleva con una rueda hasta que el anillo se encuentra totalmente cubierto de líquido. Posteriormente se desplaza hacia abajo la mesita girando el tornillo micrométrico en contra de las agujas del reloj. A continuación se aplica un tirón hacia arriba y se lleva a cabo el descenso del contenedor de medida, hecho que se repite hasta que se rompa la película (el anillo sale fuera de la superficie, este momento se corresponde con la tensión superficial del líquido en mN/m³).

2.5. SÍNTESIS DE LOS GELES DE PROTEÍNAS SANGUÍNEAS

2.5.1. Redes poliméricas

Los geles que formaron redes poliméricas fueron sintetizados con glicerol (Panreac) como agente gelificante. El glicerol fue añadido a las soluciones de plasma, cuyo contenido proteico fue determinado por el método Lowry (Lowry, 1951), hasta lograr concentraciones de 30, 50, 70, 200 y 500 g de glicerol/100 g de proteína. Las mezclas se agitaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, siendo posteriormente ajustadas a pH 2, 7 y 10 con HCl 0.5M ó NaOH 0.5M. Se han escogido estos valores ya que se ha pretendido simular la acidez de productos alimentarios como los limones, ciruelas o algunas mermeladas (que presentan un pH alrededor de 2), la neutralidad de la carne de cerdo, pollo o pescado fresco (pH próximo a 7) o la basicidad de los huevos blancos (pH en torno a 10). A continuación, fueron colocadas en placas de cristal de 80 mm de diámetro (TDS Pierron) añadiendo aproximadamente 3 g de solución en cada una. Finalmente, fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 horas.

2.5.2. Dispersiones agregadas

Los geles que formaron dispersiones agregadas fueron sintetizados aplicándoles un tratamiento térmico inducido. En esta memoria se han realizado dispersiones agregadas de soluciones de las dos fracciones sanguíneas (plasmática y celular). Las soluciones frescas y en su caso las liofilizadas fueron redisueltas en agua destilada hasta conseguir una concentración de proteína del 10% (p/p) y fueron ajustadas a pH 2, 7 y 10 (por las mismas razones que las mencionadas en el caso de las redes poliméricas) con HCl 0.5M o NaOH 0.5M. A continuación, fueron colocadas en placas de cristal de 80 mm de diámetro (TDS Pierron) añadiendo aproximadamente 3 g de solución en cada una siendo calentadas a 85 ± 1 °C durante 45 min en un incubador (J.P. Selecta 2000209). Una vez producida la gelificación las muestras fueron inmediatamente enfriadas a 20 ± 1 °C durante 15 min, y después fueron almacenadas a 4 ± 1 °C durante 24 horas antes de ser analizadas.

2.6. MÉTODOS ANALÍTICOS Y DE CARACTERIZACIÓN

2.6.1. Fracciones sanguíneas

2.6.1.1. Método de Lowry

Para la determinación de proteínas se empleó el método de Lowry (Lowry, 1951), que se basa en que los enlaces peptídicos de las proteínas en condiciones alcalinas forman un complejo con el Cu^{2+} y lo reducen a Cu^+ . El Cu^+ y los aminoácidos Trp y Cys reaccionan con el reactivo de Folin para dar una coloración azul cuya intensidad variará en función del contenido en Trp y Cys de la muestra.

Las soluciones que se necesitan para llevar a cabo esta cuantificación proteica son:

- Solución A: 10 g de Na_2CO_3 + 2 g de NaOH + 500 mL de agua destilada.
- Solución B1: 1 g de CuSO_4 + 100 mL de agua destilada.
- Solución B2: 2 g de tartrato sódico-potásico + 100 mL de agua destilada.
- Solución C: 98 mL de A + 1 mL de B1 + 1 mL de B2, este reactivo debe ser preparado cada vez que se va a hacer el análisis.
- Reactivo de Folin: diluido 1:1 con agua destilada.

El método consiste en añadir sobre 1 mL de muestra 5 mL de reactivo C (cobre alcalino). A continuación se agita y se espera 10 minutos. Posteriormente se añaden 0.3 mL de la solución del reactivo de Folin, se ajusta y se mantiene en reposo durante 30 minutos. Por último se mide la absorbancia en el espectrofotómetro Shimadzu UV-vis Modelo 1203 a una longitud de onda de 500 nm. Previamente al análisis de una muestra se debe hacer una curva de calibrado con albúmina en agua destilada a concentración entre 10 y 500 ppm, y se representan estas frente a absorbancia y obteniéndose la relación entre la absorbancia de la muestra y la concentración.

2.6.1.2. Determinación de cationes

Se utilizó la técnica de espectrofotometría de absorción atómica para determinar la concentración de cationes que hay en una disolución en base a la energía que estos absorben cuando se aplica una radiación con una longitud de onda característica.

El equipo que se utilizó fue un Philips modelo PU 9100 que consta de un espectrofotómetro donde se instalan las lámparas de cátodo hueco de los metales a analizar. Primero se establece la longitud de onda característica de cada elemento, se fija la anchura de la rendija según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se optimiza la longitud de onda hasta que se obtiene la ganancia óptima de energía.

A continuación se introduce la corriente de aire-acetileno y se enciende la llama. El cero se consigue aspirando un blanco de agua destilada. Se hace una recta de calibrado empleando cuatro concentraciones crecientes de cada solución patrón de metal. Una vez obtenida la relación absorbancia/concentración para cada catión se procede a medir las muestras las cuales deben estar dentro de un rango de valores obtenidos para los patrones (Tabla 14).

Tabla 14. Parámetros instrumentales de los cationes determinados

	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Na
λ (nm)	422.7	324.8	248.3	766.5	285.5	589
Banspass	0.2	0.2	0.2	0.5	0.2	0.2
I (mA)	5	4	12	6	3	7

2.6.1.3. Determinación de aniones

Para la determinación de los aniones presentes en el plasma se utilizó un cromatógrafo iónico con una columna selectiva de aniones, modelo DIONEX 2000, SP con columna AS4sc. La fase móvil fue reguladora carbonato/bicarbonato sódico en una concentración 1.7/1.8 M y la disolución regenerante ácido sulfúrico 20 mM.

La metodología de operación consistió en conectar el aparato y ajustar el flujo del eluyente a 2 mL/min. A continuación se realiza el calibrado, para ello se inyectan patrones con una mezcla de concentraciones especificadas por el fabricante. El cromatógrafo determina los tiempos de retención aproximados para cada anión según las condiciones de operación y a la vez realiza la conversión de superficies a concentraciones. Así se consigue la identificación de cada anión a la vez que la concentración del mismo en la muestra analizada.

2.6.1.4. Medida del pH

La medida del pH se llevó a cabo utilizando un pHmetro Crisol, microPH 2001.

2.6.1.5. Humedad

Para determinar la humedad se utilizó el analizador halógeno de humedad Mettler Toledo HR73 (Figura 10). Este equipo opera de acuerdo con el principio termogravimétrico: al comienzo de la medida determina el peso de la muestra y, después, esta es rápidamente desecada con el secador halógeno logrando así la evaporación de la humedad que pueda contener. Las muestras fueron sometidas a temperaturas de 120 °C hasta que su contenido en humedad permaneció constante en el tiempo.



Fig. 10. Analizador halógeno de humedad Mettler Toledo HR73.

2.6.1.6. Electroforesis

Con el objetivo de identificar cada una de las proteínas presentes en cada fracción se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Las muestras fueron diluidas 1:25 (v/v) en un tampón de disociación compuesto por 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.05% (p/v) de azul de bromofenol, 35% (p/v) de glicerol, 5% (v/v) β -mercaptoetanol, 8% (p/v) solución SDS y calentadas en agua hirviendo durante 5 minutos. Las muestras se colocan en un gel de poliacrilamida (gel de concentración 3.5% y gel de separación 12%) con un tampón de migración compuesto por 0.02M Tris (hydroximetil) aminometano, glicina 5M, solución SDS (p/v) 0.1%. La solución de teñido estaba compuesta por: 0.1% (p/v) azul de Coomassie, 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético y 40% (v/v) de agua destilada. La composición de la disolución de desteñido fue: 10% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) de metanol y 50% (v/v) de agua destilada. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Proteínas de alto peso molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) (Bio-Rad) fueron utilizadas como patrones.

2.6.2. Geles proteicos sanguíneos

2.6.2.1. Determinaciones reológicas

Los análisis reológicos han sido llevados a cabo utilizando un reómetro rotacional (Haake MARS II) con un sistema Peltier para control de la temperatura, que se encuentra en la unidad de Tecnología Alimentaria de los Servicios Científico- Técnicos de la Universidad de Oviedo (Fig. 11). Antes de comenzar cada medida las muestras se han dejado estabilizar al menos 15 min., contrarrestando así el estrés inducido durante la carga de las mismas (Laca y cols., 2009), y para evitar la desecación durante los análisis se han empleado aceite de silicona y cubiertas de cristal. Las muestras se han analizado por triplicado.

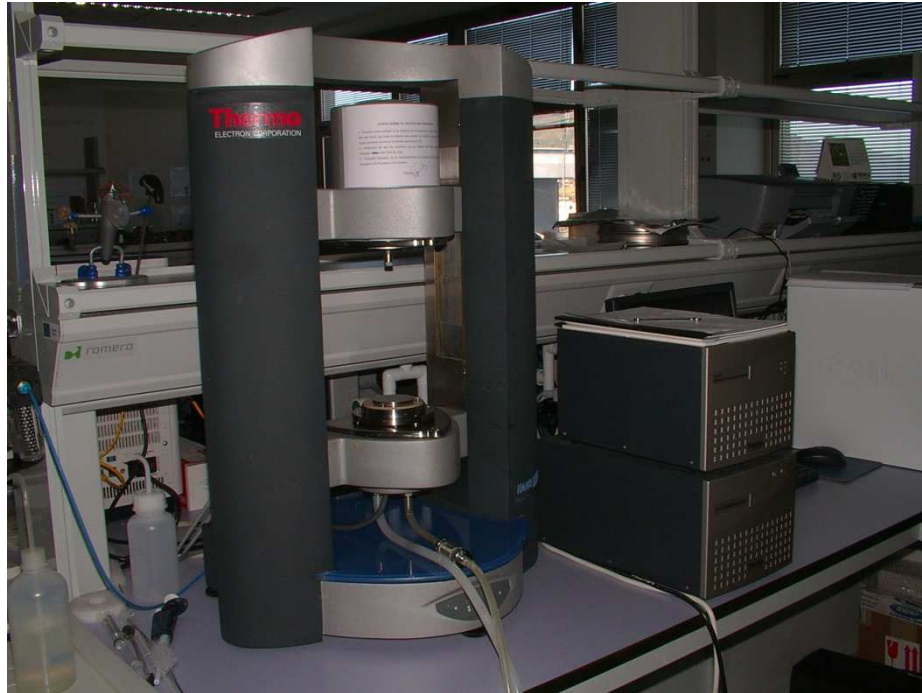


Fig. 11. Reómetro rotacional Haake MARS II.

En estado estacionario, las curvas de flujo se han llevado a cabo en modo de estrés controlado CS (Controlled Stress) a 6 ± 1 °C de 0 a 50 Pa de esfuerzo cortante. Estos análisis nos permiten clasificar los diferentes tipos de fluidos. La ley de Herschel-Bulkley (Steffe, 1996) puede considerarse como un modelo para describir el comportamiento de los fluidos no Newtonianos:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad \text{Ley de Herschel-Bulkley (20)}$$

dónde τ es el esfuerzo cortante (Pa), τ_0 es el punto de fluencia (Pa), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (s^{-1}), k es el coeficiente de consistencia ($Pa \cdot sn$) y n es el índice de comportamiento (adimensional). Esta ecuación es muy adecuada ya que los fluidos Newtonianos, los pseudoplásticos (cuando $0 < n < 1$), los dilatantes ($1 < n < \infty$) y los plásticos de Bingham pueden considerarse casos especiales del modelo de Herschel-Bulkley (como puede observarse en la Tabla 15).

Tabla 15. Fluidos Newtoniano, dilatante, pseudoplástico y plástico Bingham como casos especiales del modelo Herschel-Bulkley (Steffe, 1996)

Fluido	k	n	τ_0
Herschel-Bulkley	>0	$0 < n < \infty$	> 0
Newtoniano	>0	1	0
Pseudoplástico	>0	$0 < n < 1$	0
Dilatante	>0	$1 < n < \infty$	0
Plástico-Bingham	>0	1	> 0

En condiciones transitorias, los ensayos de fluencia y recuperación nos permiten comprender la estructura interna de los geles. En los análisis de fluencia se aplicó a la muestra un esfuerzo instantáneo de 40 Pa durante 60 segundos a 20 ± 1 °C. Los de recuperación, también a 20 ± 1 °C., duraron 180 segundos. Uno de los modelos que mejor refleja la deformación de un sistema es el modelo de Burger de cuatro componentes, ya que representa la asociación del comportamiento puramente elástico o puramente viscoso en series (modelo de Maxwell) o en paralelo (modelo Kelvin-Voigt). En el modelo de Burger, el sistema de deformación llamado complianza, J, corresponde a la siguiente ecuación (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (21)$$

dónde J_0 es la complianza instantánea, J_1 es la complianza retardada, λ_{ret} es el tiempo de retardo (tiempo para alcanzar la máxima deformación) y μ_0 es la viscosidad Newtoniana del amortiguador libre. La suma de J_0 y J_1 es llamada complianza en estado estacionario (J_{0e}) y λ_{ret} representa el cociente $\frac{\mu_0}{G_0}$, dónde G_0 es el módulo instantáneo elástico de la unidad Maxwell. Obteniendo los valores de J_{0e} , $\mu_0 G_0$ y λ_{ret} podemos comparar la estructura de los geles, ya que nos proporciona un modelo mecánico responsable de la deformación.

En condiciones dinámicas, los barridos de estrés, que se llevaron a cabo desde 0.01 a 500 Pa a una frecuencia fija de 1 Hz, nos permiten conocer el rango viscoelástico por el que se mueven las muestras. Los barridos de temperatura, que se realizaron en el rango de viscoelasticidad lineal, nos indican a qué temperatura las soluciones

experimentaron una fase de transición de líquido a gel. A este respecto se han llevado a cabo rampas de temperatura de calentamiento y de enfriamiento. La primera desde 20 a 110 °C (con una tasa de calentamiento de 0.6 °C/min) y la segunda desde 110 a 0 °C (con una tasa de enfriamiento de 0.6 °C/min). Asimismo se ha estudiado el efecto de diferentes temperaturas sobre los geles ya formados. En concreto se han ensayado temperaturas desde 0 a 100 °C, con una tasa de calentamiento de 0.6 °C/min. Estos análisis se han llevado a cabo en modo CS a un constante esfuerzo cortante de 10 Pa.

Aunque la detección experimental del punto de gelificación no es fácil en la práctica, Cordobés y colaboradores (Cordobés y cols., 2004) sugirieron que el punto de gel ocurre cuando G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) se cruzan a una frecuencia dada. En esta memoria el punto de gelificación ha sido determinado de esta manera.

2.6.2.2. Análisis térmico diferencial

Los análisis térmicos diferenciales de las muestras fueron llevados cabo empleando un equipo DSC 822e (Metler Toledo). Se realizaron rampas de temperatura de 25 a 120 °C (a una velocidad de calentamiento de 0.6 °C/min) seguidas de un segundo ensayo de 25 a 120 °C para comprobar la irreversibilidad de la reacción. La temperatura de gelificación (T_g) fue determinada teniendo en cuenta que los picos endotérmicos coinciden con el momento de la coagulación (Cordobés y cols., 2004). Los análisis fueron realizados por duplicado.

2.6.2.3. Análisis de la distribución granulométrica

Los geles fueron analizados por un analizador del tamaño de las partículas (Malvern Mastersizer) siguiendo el procedimiento descrito por Worrasinchai (Worrasinchai y cols., 2006). La medida del tamaño de las partículas se presenta como el diámetro de volumen medio ponderado: $d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$, donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i . Además hay dos relaciones que nos permiten determinar el grado de dispersión de tamaños de partículas: D_{10}/D_{50} y D_{50}/D_{90} , donde D_{50} ($d_{4,3}$)

representa el diámetro medio de las partículas y D90 corresponde al tamaño de partícula tal que el 90% de las partículas son menores o iguales a ese tamaño. La distribución es monodispersa cuando el cociente entre estos índices es igual a la unidad, por el contrario un sistema puede ser muy polidisperso cuando las relaciones entre ellos tienden a ser pequeñas. Las muestras de los geles de plasma con glicerol se almacenaron a temperatura de refrigeración (4 °C). Se analizaron dos muestras diferentes de cada gel y cada muestra se midió por triplicado.

2.6.2.4. Análisis de la microestructura

Se caracterizaron secciones transversales de los geles por microscopía electrónica de barrido en un microscopio electrónico de barrido JEOL Deba -6100 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). Todas las muestras, de aproximadamente 0.5 g, fueron sometidas a fijación química en tampón fosfato 0.025M (pH 6.8, Panreac) con el 3% de glutaraldehído (v/v, Panreac). Tras una hora las muestras fueron lavadas nuevamente dos veces en el mismo tampón fosfato durante 15 min. A continuación las muestras fueron deshidratadas sumergiéndolas durante 15 minutos en disoluciones acuosas con una concentración creciente de etanol al 96% (Panreac) (20, 40, 60, 80 y 100 (dos veces) % v/v etanol en agua). Una vez en etanol absoluto, las muestras se transfirieron al 100% de acetona (Panreac) de modo similar, sumergiéndolas durante 10 minutos en disoluciones de etanol con una concentración creciente de acetona (30, 50, 70, 90 y 100 (dos veces) % v/v acetona en etanol). Posteriormente las muestras fueron desecadas por punto crítico con CO₂ (Critical Point Dryer Balzers CPD 030, Polaron). Una vez secas las muestras se montaron sobre soportes de aluminio con cinta de carbón adhesiva de doble cara y se bombardearon con oro en un evaporador al vacío (Balzers SCD004, BAL-TEC AG).

2.6.2.5. Determinación de la capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) fue determinada de acuerdo a los métodos basados en la centrifugación (Kneifel y cols., 1991). Una cantidad de muestra de 1 g se centrifugó a temperatura ambiente (20 °C), 20000xg durante 5 min (Centrifuga

Eppendorf 5415R) y se pesó la cantidad de agua liberada. La capacidad de retención de agua fue expresada de acuerdo al porcentaje de pérdida de agua, según la ecuación descrita por Chantrapornchai y McClements (Chantrapornchai & McClements ,2002):

$$\% \text{ de pérdida} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (22)$$

dónde m_i es la masa inicial de la muestra m_f es la masa después de la centrifugación.

2.6.2.6. Liofilización

Se evaluó la liofilización como método de secado de las muestras. Las muestras fueron liofilizadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.1 mb (Liofilizador Telstar modelo Cryodos) durante 24 horas, para lo que es necesario que se congelen previamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los geles sintetizados con proteínas liofilizadas fueron evaluados desde un punto de vista reológico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3:
DESMINERALIZACIÓN DE PLASMA

La sangre animal procedente de los mataderos es susceptible de ser recuperada y revalorizada ya que presenta un alto contenido en proteínas. Antes de llevar a cabo la purificación de las proteínas de la fracción plasmática se debe proceder a eliminar los componentes minerales que contiene. Esto se hace necesario porque es conveniente en el caso de que las proteínas vayan a ser destinadas a alimentación humana y porque mejora el proceso final de separación y purificación de las mismas.

Existen numerosas técnicas que permiten eliminar los iones presentes en el plasma sanguíneo. Sin embargo, en la industria alimentaria se utilizan fundamentalmente dos, el intercambio iónico y las técnicas de membranas. En el presente capítulo se analizan estos dos procedimientos de desmineralización. En el primer artículo se muestran las ventajas de las técnicas de intercambio iónico y en el segundo se comparan dichas técnicas con los procesos de membranas (en concreto, ultrafiltración) desde un punto de vista técnico.

DEMINERALIZATION BY ION EXCHANGE OF SLAUGHTERHOUSE PORCINE BLOOD PLASMA

F. MOURE¹, P. DEL HOYO¹, M. RENDUELES² and M. DÍAZ^{1,3}

¹*Department of Chemical Engineering and Environmental Technology*

²*Project Management Area
University of Oviedo
C/ Julián Clavería s/n 33071, Oviedo, Spain*

Accepted for Publication July 5, 2007

ABSTRACT

The blood from slaughterhouses constitutes an important waste from the meat industry because of its high pollutant power. The techniques used to recover blood components, such as proteins for human food, require pretreatments to remove inorganic salts. Cationic and anionic ion exchange resins were used to carry out the demineralization process. Capacity experiments were first conducted in batch to study the performance of the resin, and then the operation was carried out in a fixed bed to simulate an industrial operation. Breakthrough curves for the main cations and anions contained in the plasma were obtained, which showed the good applicability of this operation for demineralizing blood plasma. The loss of protein is always below 9%, being slightly higher in the cationic column, while the variation in pH is also greater in the cationic column, although the changes are not important enough to cause substantial denaturalization of the plasma proteins.

PRACTICAL APPLICATIONS

Ion exchange processes are used in food industries in many applications, for instance in sugar production. In this work, the application of ion exchange for the demineralization of blood plasma as a preparative step to the fractionation of the main protein fractions has been demonstrated. The results show the potential applicability of the technique, which could be potentially used at the industrial level. The loss of protein in the process is not elevated, and the variation of the pH of the final products is more important in the

³ Corresponding author. TEL: +34-985-103439; FAX: +34-985-103434; EMAIL: mariodiaz@uniovi.es

case of cationic exchange. Ion exchange could be used industrially in the demineralization of other liquid effluents of the food industry containing proteins or other compounds as an operation prior to the preparation of the effluent to separate its components as a first purification step.

INTRODUCTION

Ion exchange processes are frequently used in the recovery of ions from diluted solutions, for instance, the recovery of uranium in the nuclear industry or metals such as copper or cadmium in the hydrometallurgy industry. The aim of the process may differ (Wang *et al.* 2002), e.g., the recovery of a very expensive (and pollutant) ion in the first case, or to avoid pollution caused by wastewater in the second. Water demineralization by ion exchange processes is commonly employed in food industries to obtain soft water to be used in the production process. Whey demineralization in the dairy industry (Houldsworth 1980) and sugar or citric acid production are some examples of the direct application of ion exchange operations integrated in the food production process.

Blood is one of the most problematic by-products generated by the meat industry because of the great volumes produced and its pollutant load. Blood production in the U.K., for instance, is around 100,000 tons per year. Characteristics such as high amounts of solids (18%) in blood composition and chemical oxygen demand (COD) values around 500,000 mg O₂/L constitute very serious environmental problems stemming from this type of waste. There are some applications for this by-product in animal food processing by means of drying, but the real revalorization of blood is based on protein recovery and applications in human food and other type of industries.

Separation and purification processes of blood proteins require prior separation of the liquid fraction of the blood (plasma) from the cellular fraction. Plasma is basically made up of proteins (8%), water (91%) and a small fraction of inorganic salts and low-molecular-weight compounds (1%). Plasma proteins comprise basically all those found in blood, except for hemoglobin, the majority protein in the cellular fraction. From the plasmatic fractions, globulins are the most important fraction (56%), followed by the albumin fraction (42%), and finally, fibrinogen, which represents 2% of plasma proteins.

Prior to plasma protein separation, it is necessary to remove the inorganic salt fraction from the plasma (Rendueles *et al.* 1996). The presence of salts can interfere with and compete in the subsequent separation and purification steps, depending on the techniques employed (Moure *et al.* 1999, 2004). On the other hand, the removal of mineral components is usually required to use plasma proteins as additives in food applications (ice cream, cakes, bread, etc.).

Several well-known techniques, such as ion exchange, membranes and precipitation, have been developed to remove inorganic compounds (Marinsky 1984; Dion *et al.* 1990) from blood plasma. Ion exchange is a competitive technique in some specific cases (Helfferich 1962; Ruthven 1984; Watson 1990), competing with membrane processes. In this study, ion exchange is tested as a demineralization technique to obtain plasma suitable to be used for subsequent protein fractionation, with the aim of examining the feasibility of this operation to demineralize blood plasma. First, cationic and anionic resins were selected on the basis of their retention capacity, elution feasibility and low protein loss as the main properties in order to choose the most suitable ion exchange resin (Dorfner 1991). Subsequently, column operation was carried out to evaluate the efficiency of the operation both for cationic and anionic resins, bearing in mind that the fixed-bed operation is more appropriate for industrial production.

MATERIALS AND METHODS

The blood from porcine species used in this work was obtained from the Junquera Bobes slaughterhouse (Noreña, Asturias, Spain). As the animal was bled, blood was taken and sodium citrate (1%) (Panreac, Barcelona, Spain) was added as an anticoagulant. The blood was then centrifuged at $20,000 \times g$ for 20 min in order to separate the plasma (60% v/v) from the cells (40% v/v) in a Kubota 6700 centrifuge (Kubota Corporation, Tokyo, Japan).

Ion Exchange Resins

After several tests with different resins to determine the best option, a polystyrene sulfonic-type gel cationic resin, Lewatit S-100 (Lanxess Chemicals, Leverkusen, Germany), was used to remove cations from the plasma. Two polystyrene macroporous resins were tested for the removal of anions: a weak base resin, Lewatit MP-62, with ternary amines as the functional group, and a strong base resin, Lewatit MP-500, with quaternary amines as the functional group (both manufactured by Lanxess Chemicals). Their main characteristics are summarized in Table 1.

Cationic Exchange

Thirty milliliters of raw blood plasma was added to 1 g of Lewatit S-100 resin, taking samples at different times up until 60 min in order to monitor the process kinetics, i.e., the variation in the concentrations of Na^+ , K^+ and Ca^{2+} in the plasma with time. The same procedure was repeated for 2, 3 and 5 g of resin.

TABLE I.
CHARACTERISTICS OF THE RESINS (A) LEWATIT S-100, (B) LEWATIT MP-62 AND
(C) LEWATIT MP-500

Type	A	B	C
	Na cationic	Free alkali anionic	Cl ⁻ anionic
Color	Amber	Beige	Beige/opaque
Basic matrix	Polystyrene	Reticulated polystyrene	Cross-linked polystyrene
Active groups	Sulfonic	Ternary amine	Quaternary amine, type 1
Granulometry (mm)	0.3–1.25	0.32–1.25	0.47 (±0.06)
Apparent density (kg/m ³)	800–900	670	1,060
Humidity (wt %)	42–45	50–55	62
Total capacity (mol/L)	2.2	1.7	2
Useful capacity (mol/L)	1.6	1.23	1.4
Thermal stability (C)	–10 to 120	–20 to 100	–20 to 100
pH stability	1–14	0–14	0–14

To obtain the breakthrough curves for the three main cations indicated earlier, a column of borosilicate glass (Amicon, model G32 × 250, Millipore Co., Billerica, MA) with an internal diameter of 32 mm and a bed height of 120 mm was employed. A peristaltic pump (Masterflex 7554-60, Cole-Palmer Co., Vernon Hills, IL) provided with silicone tubes (model 96400-16, Cole-Palmer) was used to pump the feed. The feed flow rate was 2.5 mL/min, 400 mL of raw plasma being introduced in the column in each experiment.

During the runs, a sample was taken each 5 min up until 3.5 h. Subsequently, washing with distilled water was carried out in order to determine the physical occupation of the plasma in the pores of the resin (intra- and inter-particle). Two fractions were collected from the rinse waters: one of 100 mL and a second of 500 mL. Regeneration was carried out with 1-N HCl (Merck, Darmstadt, Germany) for 35 min, taking a sample each 5 min. In every sample, the following parameters were analyzed and determined: pH (using a Crison microPH 2001 pH meter, Crison Instruments, Columbia, MD), cation concentrations (Na⁺, K⁺, Ca²⁺) (using an atomic absorption spectrophotometer [Philips PU-9100, Philips Electronics, Amsterdam, the Netherlands]), and protein concentration by the Lowry method and by measuring the absorbance on an ultraviolet spectrophotometer (Shimadzu UV 1203, Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD) at 280 nm.

Anionic Exchange

Two Lewatit resins (MP-62 and MP-500, a weak and strong base, respectively, as mentioned earlier) (Dorfner 1991) was tested to compare their performance. In both cases, 50 mL of raw blood plasma was added to 1 g of

resin, taking samples at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 and 60 min. The same procedure was repeated with 2, 3 and 5 g of each resin in order to monitor the process kinetics.

Breakthrough curves were obtained for F^- , Cl^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} , as these are the main anions present in plasma. The same borosilicate glass column (Amicon, model G32 \times 250) was used for these experiments, the bed height was adjusted to 60 mm and the same setup as in the cationic case was employed. A flow rate of 1.5 mL/min was fixed, and 60 mL of raw blood plasma was introduced in the column, a sample being taken every 2 min up until 60 min. Once loading was completed, the column was washed with 125 mL of water, distributed in 25 mL in a first step and 100 mL in a second step. Finally, the resin was regenerated with 0.5-N NaOH for 35 min, taking samples every 2 min. pH, anion concentrations (F^- , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) and protein concentration were determined in each sample. An ionic chromatograph (Dionex 2000 i/sp, Dionex Co., Sunnyvale, CA) equipped with an AS4sc column was used to determine anion concentration.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of Blood and Plasma

Characterization of blood and plasma was initially carried out. Values of the physicochemical parameters obtained for both fluids are summarized in Table 2.

The main ions are sodium as cation and chloride as anion, both representing 85% of total ions.

TABLE 2.
PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THE PLASMA

Ca^{2+} (mg/L)	80
K^+ (mg/L)	200
Na^+ (mg/L)	2,500
F^- (mg/L)	65
Cl^- (mg/L)	3,000
NO_3^- (mg/L)	75
PO_4^{3-} (mg/L)	95
SO_4^{2-} (mg/L)	300
pH	7.3
Density (kg/L)	1.04
Viscosity (cp)	2.33
Solids (%)	9.1
Protein (%)	9

Three replicates have been carried out in each analysis.

Demineralization by Ion Exchange

As mentioned earlier, the inorganic ion concentration of the total plasma is approximately 1%. The breakthrough and elution curves for those cations present at high concentrations (Na^+ , Ca^{2+} and K^+) were obtained experimentally, as this is the most interesting data for determining the feasibility of the demineralization process by ion exchange.

Cationic Exchange. Capacity Experiments. Measures of the cations from each sample were carried out under the conditions referred to in the experimental section in order to study the demineralization process using the Lewatit S-100 resin. Results obtained for Na^+ in two different liquid/solid ratios (L/S, milliliter of plasma/grams of resin) are shown in Fig. 1 as an example. Cation removal was highly effective. The experimental results show that equilibrium is reached in approximately 10 min.

Column Experiments. Load. The breakthrough curves for Na^+ and K^+ cations are shown in Fig. 2. Breakthrough times, bed volumes corresponding to breakthrough time and the useful capacity of the resin for each cation are summarized in Table 3. The bed volume value was calculated from Eq. (1). V_{resin} in this equation is the real volume occupied by the resin and is calculated as $V_{\text{resin}} = V(1 - \varepsilon_b)$, V being the total volume of the column cylinder and ε_b the

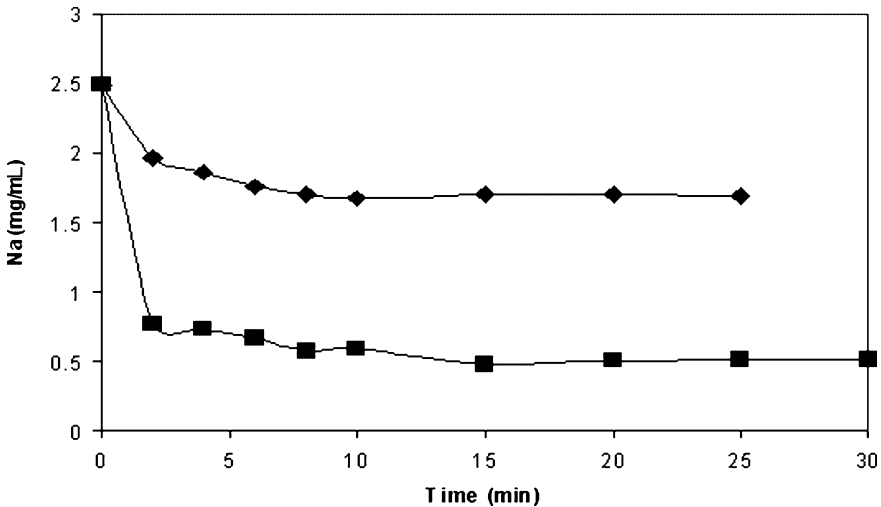


FIG. 1. Na^+ CONCENTRATION WITH TIME IN LEWATIT S-100 RESIN
 (◆) L/S = 30-mL/g resin; (■) L/S = 6-mL/g resin.
 L/S, liquid/solid ratio.

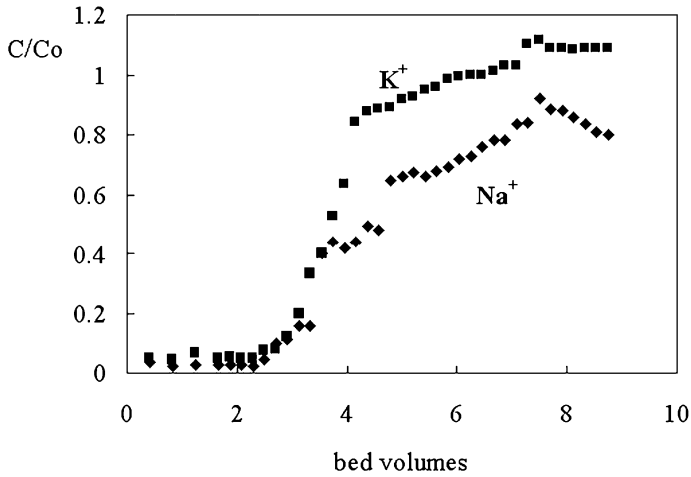


FIG. 2. EXPERIMENTAL BREAKTHROUGH CURVE FOR Na⁺ (◆) AND K⁺ (■) CATIONS IN LEWATIT S-100 RESIN
C/Co, co-initial concentration.

TABLE 3.
AVERAGE EXPERIMENTAL RESULTS FOR THE CATION EXCHANGE

	Breakthrough time (min)	Bed volumes	q_u (mequiv cation/L resin)	Co/q_u
Ca ²⁺	65	2.7	1.82	43
Na ⁺	70	2.9	106	24
K ⁺	70	2.9	14	42

Three replicates for each analysis.
 q_u , useful capacity; Co , co-initial concentration.

bulk porosity, measured as 0.38 in the columns used (Fernandez *et al.* 1994). The useful capacity, q_u , corresponds to the breakthrough time of each breakthrough curve (Watson 1990).

$$bv = \frac{t(\text{min}) \times F(\text{mL}/\text{min})}{V_{\text{resin}}(\text{mL})} \tag{1}$$

The selective order of this resin for the studied cations is Ca²⁺ > K⁺ > Na⁺ at 0.1 M in a single solution. However, the initial concentration of sodium is much higher than the rest, which implies that the capacity is higher for this cation. Multicomponent equilibrium is difficult to analyze, as plasma is a complex fluid and many factors influence equilibrium.

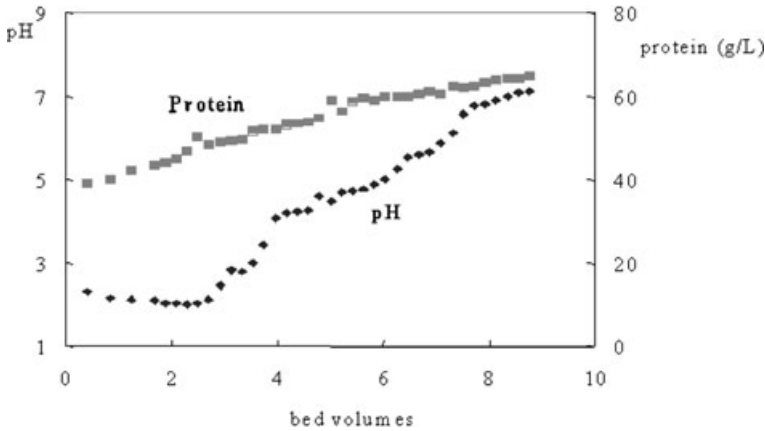


FIG. 3. EVOLUTION OF pH (◆) AND PROTEIN CONCENTRATION (■) WITH TIME ALONG THE CHARGE OPERATION WITH THE CATIONIC COLUMN

The experimental results show a high retention capacity for all the cations studied, and the breakthrough curves show no high dispersion. Demineralization is not complete because there are many proteins that have a strong affinity by certain ions, thus making their complete removal almost impossible.

Protein loss and pH evolution. Changes in collateral parameters during demineralization were also studied, as they are very important for the process to operate adequately. pH value and protein concentration were monitored as the most interesting parameters. pH value shows a large decrease during the first minutes (Fig. 3) following the load step as a result of massive discharge of protons linked to the matrix (the resin was initially presaturated with H^+ from the previous elution step). This low pH can involve the denaturation of some proteins when applying this technique to plasma, which may not be appropriate for the purification process.

The aim of the load step is to obtain the least possible concentration of cations while at the same time avoiding the retention of proteins by the resin. Taking the initial values of untreated plasma as reference, 70 g/L for protein concentration and 2,500 mg/L for sodium cation concentration, the total percentage of nonretained protein increases and the total percentage of retained ions decreases as the load step proceeds. Balancing the negative effect of the loss of protein with the positive effect of the removal of ions from the plasma, we estimated the optimal period of time for loading under the experimental conditions used in the tests to be around 2.9 bed volumes (i.e., 174 mL of plasma passed through the column).

TABLE 4.
AVERAGE RESULTS OF THE CATION EXCHANGE LOAD AT 2.9 BED VOLUMES (*bv*)

Plasma	pH	Ca ²⁺ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Na ⁺ (mg/L)	Protein (g/L)	<i>q_u</i> (mequiv cations/L resin)
Initial time	7.7	80	200	2500	70	–
<i>bv</i> = 2.9	2.45	14	24	280	52	121.8

Three replicates for each analysis.
q_u, useful capacity.

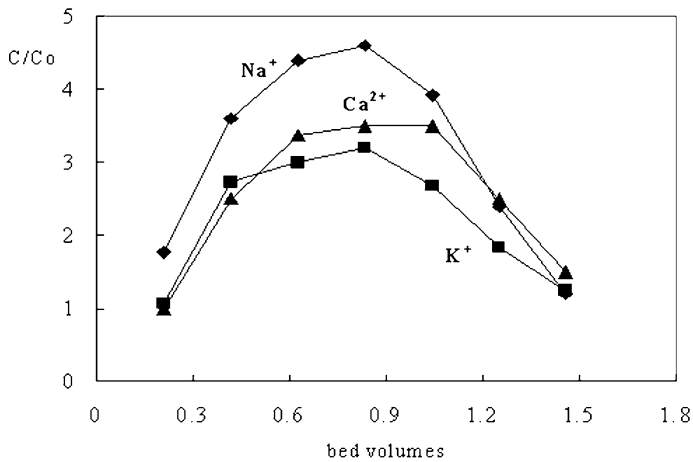


FIG. 4. CONCENTRATION OF Na⁺ (◆), K⁺ (■) AND Ca²⁺ (▲) IN THE ELUTION STEP FOR THE CATIONIC COLUMN
Initial concentration (C₀) for Na⁺ (2,500 mg/L), K⁺ (200 mg/L) and Ca²⁺ (80 mg/L).
C/C₀, co-initial concentration.

Cation concentrations, protein concentration, pH and useful capacity of this resin at the initial time and at the aforementioned 2.9 bed volumes are summarized in Table 4. The experimental results show a loss of protein of around 25%, and a decrease in pH below 2.9. This is not appropriate, because the pH of blood plasma proteins is between 4.4 and 5.4 and proteins run the risk of precipitating at a pH close to 2.9.

Elution. Elution was carried out using 1-N HCl. The elution curve for Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ is shown in Fig. 4, elution being quite slow for all cations. A good ion exchange process requires very fast, efficient elution. In this case, the elution time is around 40 min, lower than the retention or load time. Hence, the process could be easily carried out using a setup provided with two columns, one on load and the other on elution, changing the cycle every 35–40 min.

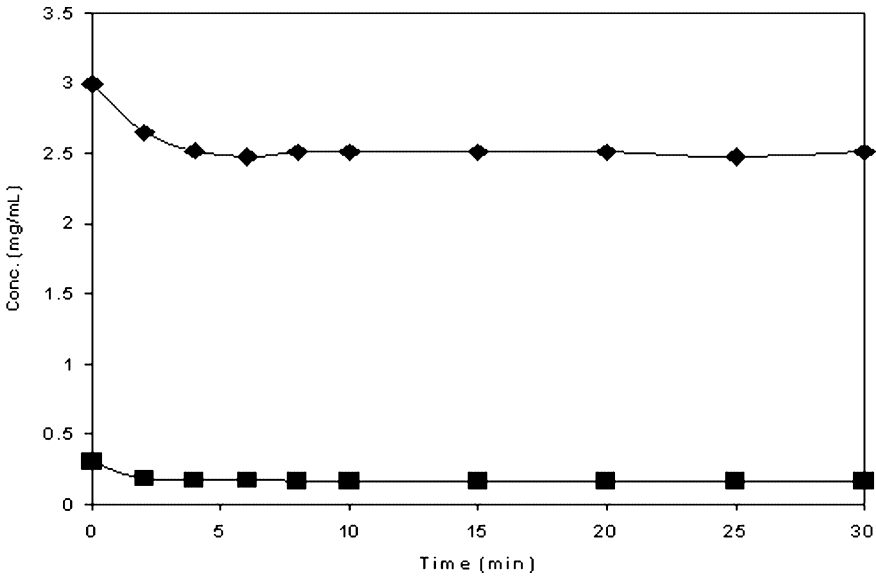


FIG. 5. EVOLUTION OF CHLORIDE (◆) AND SULFATE (■) CONCENTRATION WITH TIME IN BATCH EXPERIMENTS WITH THE LEWATIT MP-500 RESIN

Other effects. The evolution of pH during the regeneration process begins at 7.7, reaching pH = 1 at the initial time to after five bed volumes. Respective to the protein loss, in the elution step, a protein concentration has been found in the solution not exceeding 0.35 g/L at any moment of the elution curve, which represents a very low percentage with respect to the initial protein concentration of plasma (around 70 g/L). Besides these measurements, COD was also measured for this period in order to know the pollutant load of this effluent, as it constitutes a waste that must be processed in a wastewater-treatment plant. COD values were in the range of 1,000–1,500 mg O₂/L.

Anion Exchange. Capacity Experiments. In order to compare the two tested resins (Lewatit MP-62 and Lewatit MP-500), capacity experiments were carried out contacting 5 g of wet resin with 50 mL of blood plasma. Figure 5 shows the evolution of the concentration of chloride and sulfate with time for the resin Lewatit MP-500. It can be seen in this figure that the concentration of chloride decreased about 25% in 6 min when the L/S ratio was 10 mL liquid/g of wet resin added.

For the sulfate anion, the concentration decreased around 30% using the same L/S ratio. The effectiveness of the resin was very good, as the removal of anions was high even with a high L/S ratio.

TABLE 5.
AVERAGE RETENTION CAPACITIES FOR Cl^- AND SO_4^{2-} OF BLOOD PLASMA IN BATCH
EXPERIMENTS FOR LEWATIT MP-62 AND LEWATIT MP-500

L/S (mL plasma/g wet resin)	q_{Cl^-} (mg/mL wet resin)	$q_{\text{SO}_4^{2-}}$
LEWATIT MP-62		
10	17.40	2.56
20	32.76	1.52
30	33.28	1.59
LEWATIT MP-500		
10	3.09	2.19
20	5.74	1.48
30	5.98	1.85

Three replicates for each analysis.

L/S, liquid/solid ratio; q , ion exchange capacity.

The removal of chloride was also quite effective for the resin Lewatit MP-62. For an L/S ratio of 10, the concentration of chloride decreased about 65% in 10 min. Removal of NO_3^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} was better than for the chloride because of the higher affinity of the resin for these anions.

Comparing the results for both resins, it can be seen that chloride removal is more effective for Lewatit MP-62 than for Lewatit MP-500. The performance of both resins in the retention of the SO_4^{2-} anion is very similar. Capacity results are summarized in Table 5 for comparison between the two resins.

The retention capacity of Lewatit MP-62 for chloride in batch experiments is higher than for sulfate, but it must be borne in mind that the concentration of sulfate in the plasma is lower than the concentration of chloride and the ion exchange process taking place is multicomponent. For this reason, the capacity of both resins for sulfate is lower at higher L/S ratios, which is not usual. It seems that sulfate is preferred by both resins when the resin is not completely charged, and then, when the volume of liquid is higher (containing a majority of chloride), the resins are charged mainly with chloride. Therefore, it can be observed that the ion exchange capacity of Lewatit MP-500 for Cl^- and SO_4^{2-} is lower than that of Lewatit MP-62.

Column Experiments. Load. Breakthrough curves were determined using Lewatit MP-62 for F^- , Cl^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} anions, the most abundant in plasma blood, in order to study the fixed-bed anion exchange process. The resulting curves for PO_4^{3-} and SO_4^{2-} are shown in Fig. 6 as an example. The breakthrough curves for the other anions have a very similar shape. All the breakthrough curves obtained show a high degree of dispersion, as can be

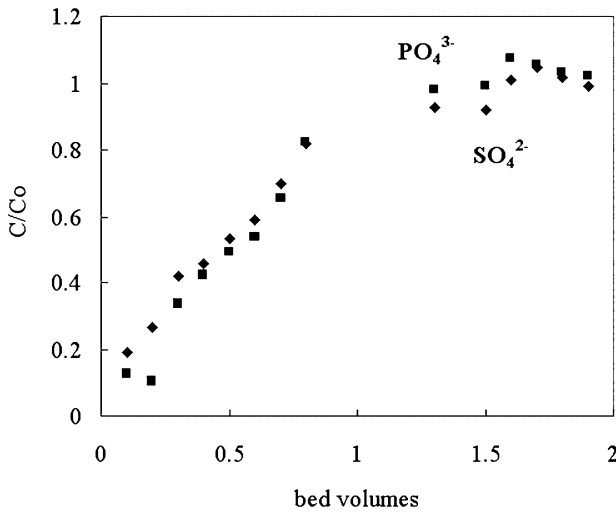


FIG. 6. EXPERIMENTAL BREAKTHROUGH CURVES OF ANIONS PHOSPHATE (◆) AND SULFATE (■) IN THE ANIONIC COLUMN (LEWATIT MP-62 RESIN) C/C_0 , co-initial concentration.

TABLE 6.
AVERAGE EXPERIMENTAL PARAMETERS FOR ANION EXCHANGE USING THE LEWATIT MP-62 AND LEWATIT MP-500 RESINS

	Breakthrough time (min)	Bed volume	q_a (mequiv anion/L resin)	C_0/q_a
Lewatit MP-62				
F^-	10	0.45	0.46	141
Cl^-	13	0.59	15.6	192
PO_4^{3-}	9	0.4	0.13	730
SO_4^{2-}	9	0.4	0.13	846
Lewatit MP-500				
Cl^-	5	2.6	28.39	127.59

Three replicates for each analysis.
 q_a , retention capacity.

observed in Fig. 6. Dispersion effects (axial dispersion, unfavorable equilibrium, low diffusion) seem to be very important in this process.

Average breakthrough times (at 50% height of breakthrough curve), bed volumes corresponding to average breakthrough time and retention capacity (q_a) for each studied anion in the charge step are shown in Table 6. As in the case of cation exchange, this anion exchange implies a multicomponent system and many parameters can influence equilibrium. If these results are

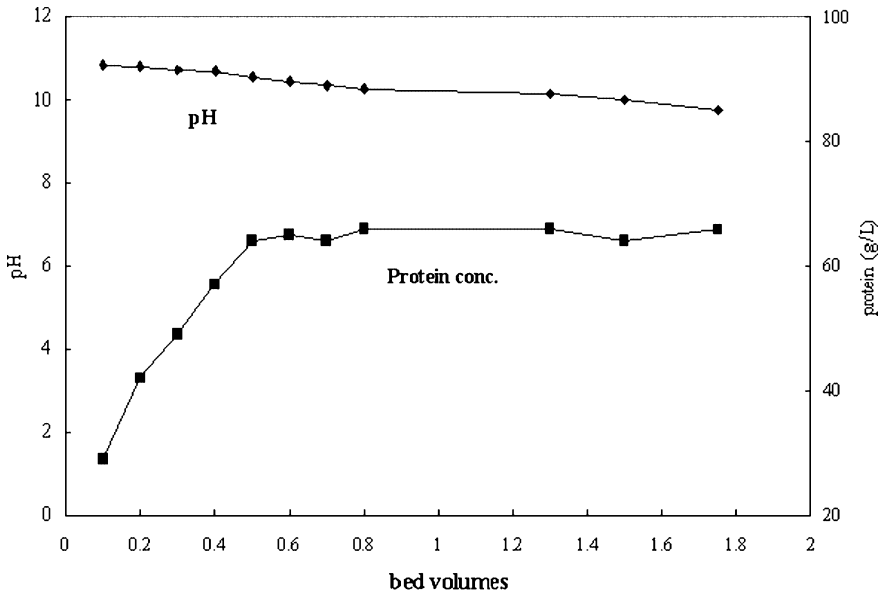


FIG. 7. pH (◆) AND PROTEIN CONCENTRATION (■) EVOLUTION WITH TIME FOR THE ANIONIC COLUMN (LEWATIT MP-62 RESIN)

compared with those obtained for the cationic resin, the operation is not efficient in this case; the low resin capacity and dispersion of the breakthrough curves means that the step is not very useful. Breakthrough curves were obtained for chloride using the resin Lewatit MP-500. The curve obtained presented less scattered behavior. Table 6 shows the capacity results for chloride in this resin.

Protein loss and pH evolution. pH and protein loss during the demineralization process were studied as they are interesting parameters to determine the feasibility of the ion exchange operation. Results are shown in Fig. 7. In terms of pH, the changes are not as drastic as in the cationic exchange process. The variations in protein concentration during the charge step are greater than for cationic exchange. However, as protein concentration reaches the initial concentration quickly (in 0.48 bed volumes), protein loss is not important.

High retention of anions and low retention of protein in the resin are the main goals of this process. Conferring the same importance on the two parameters studied as in the case of cation exchange, an operative breakthrough point would be around 0.48 bed volumes with the employed experimental conditions and column. Experimental results obtained at this bed volume are shown in Table 7.

TABLE 7.
AVERAGE RESULTS OF DEMINERALIZATION BY ANION EXCHANGE AT 0.48 BED
VOLUMES (*bv*)

Plasma	pH	Cl ⁻ (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	Protein (g/L)	<i>q_a</i> (mequiv anions/L resin)
Initial time	7.7	3,000	95	110	70	–
<i>bv</i> = 0.48	10.42	660	32	46	64	5.48

Three replicates for each analysis.

q_a, retention capacity.

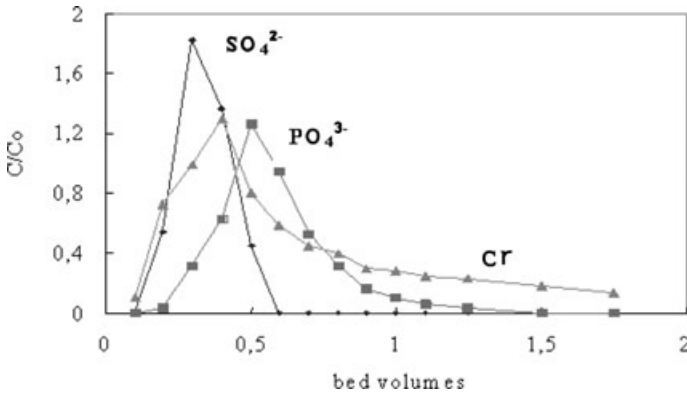


FIG. 8. ELUTION CURVES FOR SULFATE (◆), PHOSPHATE (■) AND CHLORIDE (▲) IN THE ANIONIC COLUMN (LEWATIT MP-500 RESIN)
C/C₀, co-initial concentration.

The experimental results show a loss of protein of around 8% and a decrease in pH of less than one pH unit (from 10.4. to 9.7)

Elution. A 0.5-N NaOH was used to elute the anions from the column. In general, elution of anions is fast, taking less than 10 min. Load and elution step times were similar, which allows a possible continuous process with setups composed of two equal columns, as in the case of cation exchange. The elution curves for SO₄²⁻, PO₄³⁻ and Cl⁻ are shown in Fig. 8. The order of elution is SO₄²⁻ > Cl⁻ > PO₄³⁻.

Other effects. The average protein concentration in the elution fractions is very low, always around 0.2 mg/L, which is not significant. These fractions represent a wastewater with a very similar COD value to that of the elution wastewater from the cation exchange process, between 1,000 and 1,500 mg O₂/L. This means that this effluent must be taken into account for its subsequent processing in a wastewater-treatment plant.

In conclusion, ion exchange can be used technically to demineralize porcine blood plasma. The cationic resin Lewatit S-100 presents a good capacity to retain sodium, potassium and calcium, the main cations in plasma, presenting multicomponent capacities of around 120 mequiv/L resin. The anionic resin Lewatit MP-62 presents a better capacity than Lewatit MP-500 for the anions in plasma (chloride, sulfate, nitrate and phosphate), with values of over 17 mequiv/L. The capacity for the anionic step is lower than that obtained for the cationic step because of the presence of negatively charged proteins, which can compete with the rest of anions for the active sites of the anionic resin, thus diminishing the capacity of the resin for the inorganic anions. Considering both the cationic and anionic resins, the results obtained for retention capacity are good enough to implement the demineralization process in fixed-bed columns.

Breakthrough curves demonstrated the good applicability of this operation for demineralizing plasma. The loss of protein is around 10% for the cationic process and 6% for the anionic process. The variation in pH is not sufficient in either case to cause the denaturalization of plasma proteins. The elution effluents present COD ranges between 1,000–1,500 mg O₂/L for the two effluents, indicating that these effluents must be processed in a wastewater-treatment plant before being disposed.

REFERENCES

- DION, D.M., O'CONNOR, K., PHILLIPS, D., VELLA, G.J. and WARREN, W. 1990. New family of high-resolution ion exchangers for protein and nucleic acid purifications from laboratory to process scales. *J. Chromatogr.* 535(1), 127–145.
- DORFNER, K. (ed.). 1991. *Ion Exchangers*, pp. 56–78, Walter de Gruyter, New York, NY.
- FERNANDEZ, A., RENDUELES, M., RODRIGUES, A. and DIAZ, M. 1994. Co-ion behavior at high concentration cationic ion exchange. *Ind. Eng. Chem.Res.* 33, 2789–2794.
- HELFFERICH, F. (ed.). 1962. *Ion Exchange*, pp. 20–42, McGraw-Hill, New York, NY.
- HOULDSWORTH, D.W. 1980. Demineralization of whey by means of ion exchange and electro dialysis. *J. Soc. Dairy Technol.* 33, 45.
- MARINSKY, J.A. (ed.). 1984. *Ion Exchange, A Series of Advances*, Marcel Dekker, New York, NY.
- MOURE, F., RENDUELES, M. and DIAZ, M. 1999. Fractionation of blood plasma proteins by ion exchange chromatography. *Rec. Prog. Gen. Proc.* 13(68), 405–412.

- MOURE, F., RENDUELES, M. and DIAZ, M. 2004. Plasma protein fractionation by ion exchange chromatography. *Bioprocess Biosyst Eng.* 27(1), 17–24.
- RENDUELES, M., MOURE, F., FERNANDEZ, A. and DIAZ, M. 1996. Preliminary studies in the processing of slaughter-house blood for protein recovery. *Resource Environ. Biotechnol.* 1, 193–206.
- RUTHVEN, D.M. (ed.). 1984. *Principles of Adsorption Process*, John Wiley & Sons, New York, NY.
- WANG, J., WANG, S., HAO, J. and LU, G. 2002. The desalting property of ion-exchange resins in organic solvent. *Chin. J. Chem. Eng.* 10(5), 567–569.
- WATSON, J.S. 1990. Recent developments in ion exchange 2. In *Elsevier Applied Science* (P.A. Williams and M.J. Hudson, eds.) pp. 277–280, Elsevier, London.

Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration

P. Del Hoyo ^a, F. Moure ^a, M. Rendueles ^b, M. Díaz ^{a,*}

^a *Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Oviedo, C/Julián Clavería s/n 33071 Oviedo, Spain*

^b *Project Management Area, University of Oviedo, C/Julián Clavería s/n 33071 Oviedo, Spain*

Received 13 January 2006; received in revised form 2 June 2006; accepted 23 June 2006

Abstract

The blood waste from slaughterhouses is strictly controlled due to its high pollutant load, the treatment for its purification being of great economic interest. The separation of proteins, the most valuable components of blood, in a chromatographic column requires the use of well treated plasma, in particular the removal of inorganic salts. Accordingly, a demineralization process is usually required. In this paper, ion exchange and ultrafiltration demineralization techniques were tested and the results compared. In the ion exchange experiments, the blood plasma was treated with cationic and anionic resins in packed columns, studying the removal of the major cations and anions, protein loss and pH evolution in both the loading and elution steps. In the demineralization process by means of membranes, a 10 KDa ultrafiltration membrane was used, the blood plasma being filtered to concentrate all the proteins in the retentate while removing the inorganic ions and other compounds in the permeate. The evolution of the major anions and cations in the plasma and the protein loss were studied at different volumetric concentration factors. The results obtained enable us to draw conclusions as regards the advantages and disadvantages of each technique at a laboratory scale and to offer some considerations regarding the operation at an industrial scale.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Plasma; Demineralization; Blood; Ion exchange; Ultrafiltration

1. Introduction

Among the by-products that the meat industry generates (Linden & Lorient, 1994; Ockerman & Hansen, 2000; Rendueles, Moure, Fernández, & Díaz, 1996), blood is one of the most problematic due to the great amount produced and its high pollutant load. Blood waste in the USA may be estimated from the meat produced in slaughterhouses. In 2004, meat production was 68644 million pounds weight (USDA, 2005). Bearing in mind that around 5% of the weight of the animal is blood and only a small percentage is used directly in meat products, annual blood waste in a country such as the USA could be around 1.6 million tons. This fact, together with the large amount of

solids (18%) and COD (500,000 mg O₂/L) it contains, means that the environmental problem caused by this waste is really serious. Moreover, if we consider that one of the main components of blood are proteins and that these molecules have an important economic value, the possibility of recovering the protein contained in the blood from slaughterhouses would appear to be an obvious option to consider (Deutscher, 1990).

To carry out the separation and purification of blood proteins, it is first necessary to separate the plasma (Harris, 1989), the liquid fraction of the blood, from the cellular fraction. Plasma is basically made up of proteins (7%), water (91%) and a large variety of salts and low molecular weight compounds (1%). Plasma proteins basically include all the blood proteins, except for haemoglobin, the major protein of the cellular fraction (Gras, 1983).

Before isolating the proteins, it is necessary to remove impurities, especially the ions and salts contained in the

* Corresponding author. Fax: +34 985 103434.
E-mail address: mariodiaz@uniovi.es (M. Díaz).

raw plasma. The prior separation of all these compounds from the plasma proteins can improve plasma handling as well as expediting the stage of final separation and purification of these proteins. Moreover, the removal of the mineral components present in the plasma is often necessary if it is to be employed in human foodstuffs, ice creams, cakes, bread, etc. (Ghost & Cui, 2000; Simon, Vandanjon, Levesque, & Bourseau, 2002).

Several, well-known techniques have been developed to remove inorganic compounds from blood plasma (Ghost, 2001; Ghost & Cui, 1998; Khan et al., 2000). Among these techniques, ion exchange and ultrafiltration membranes (Cheryan, 1986; Goldsmith & de Filippi, 1971) are commonly used in industry and their technology is widely known. Nevertheless, the R&D departments in companies are constantly developing new materials for ion exchange and ultrafiltration membranes in order to improve the operational conditions and efficiency of each operation. Fig. 1 shows a scheme of the two operations with all the solutions needed to run these operations.

In this study, ion exchange and ultrafiltration techniques were used to demineralize animal blood plasma. Different factors were considered in the comparison of the two techniques: firstly, the efficiency of the operation, i.e. the capacity to retain the inorganic ions and the selectivity of the process; and secondly, other collateral aspects such as protein loss during the demineralization operation, the variation in pH of the plasma throughout the process (very important for the separation of the charged proteins and their denaturation); and finally, the generation of pollutant wastewater. A qualitative discussion of the advantages and disadvantages of each demineralization operation is presented at the end of the paper.

2. Experimental methods

The blood of bovine species used in this study was obtained from Junquera Bobes slaughterhouse (Noreña, Asturias, Spain). As the animal was bled, blood was taken and an anticoagulant such as sodium citrate (Panreac) was

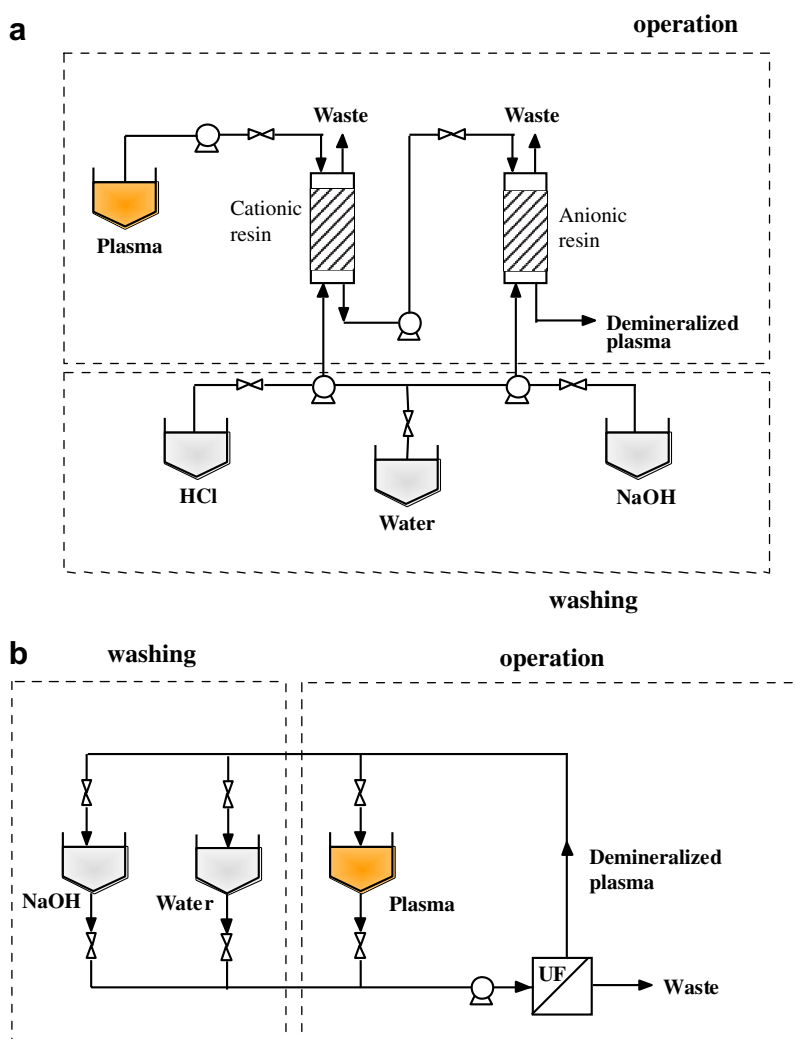


Fig. 1. Demineralization procedure using ion exchange (a) and ultrafiltration (b).

quickly added at a concentration of 1% w/v. An antiseptic such as metenamine (Panreac) was likewise added at a concentration of 0.3% w/v to avoid the growth of microorganisms. The blood was then centrifuged at 20000g for 30 min in order to separate the plasma (60% in volume) from the cells (40%) in a Kubota 6700 centrifuge using 250 mL tubes. The plasma thus obtained was kept at 4 °C to avoid bacterial proliferation. If the plasma is to be kept for more than one week before use, it must be frozen at -4 °C. The plasma was characterized in order to determine its physical properties and the concentration of the major inorganic cations and anions.

2.1. Demineralization by ion exchange

2.1.1. Cationic exchange

The first experiments were carried out to remove the cations from the plasma. To do so, Lewatit S-100, a gel-type strong acid resin (Lanxess Chemicals, Leverkusen, Germany) was used. The main characteristics of this resin are shown in Table 1.

To carry out the test to determine the retention capacity of the resin, 30 mL of raw blood plasma were added to 1 g of resin (L/S = 30), taking samples at different contact times between 0 and 60 min in order to monitor the process kinetics, i.e. the variation in the concentration of Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ in the plasma versus time. The same procedure was repeated using 2, 3 and 5 g of each resin. Contact was carried out in 100 mL volume shaken glass flasks.

The performance of the resin in fixed beds was monitored by means of breakthrough curves. These were obtained for the three major cations indicated above in a borosilicate glass column (Amicon, Millipore, mod G32 × 250) with an internal diameter of 32 mm and a bed height of 120 mm. A peristaltic pump (Masterflex, Model 7554–60) provided with silicone tubes (model 96400–16) was used to pump the feed upward. 400 mL of raw plasma was pumped into the column in each experiment at a feed flow rate of 2.5 mL/min. During the runs, samples were taken every 5 min over a period of 3.5 h. Washing with distilled water was subsequently carried out to remove the plasma retained in the column pores and to determine

the pore volume of the bed. Two fractions were collected from the wash waters: the first of 100 mL and the second of 500 mL. Regeneration of the column was performed using HCl 1 N (Merck) during 35 min, taking a sample every 5 min, maintaining the same flow rate as in the loading step, though the regeneration solution was pumped downward in this case.

The following factors were analyzed and determined in each sample, in both the loading and elution step: pH, using a Crison micropH 2001 pHmeter; cation concentration (Na⁺, K⁺, Ca²⁺), using a Philips PU-9100 atomic absorption spectrophotometer; protein concentration by means of the Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951); and absorbance using a Shimadzu UV 1203 UV–Vis spectrophotometer at 280 nm.

2.1.2. Anionic exchange

In order to remove the anions from the blood plasma, two different strong base anionic resins, Lewatit MP-62 and MP-500, both manufactured by Lanxess Chemicals (Leverkusen, Germany), were tested, the main characteristics of which are shown in Table 1. In both cases, 50 mL of raw blood plasma were mixed with 1 g of resin (L/S = 50) in 100 mL volume shaken glass flasks, samples of the liquid being taken at different times between 0 and 60 min. This period was found in previous runs to be sufficient time to reach equilibrium. Several runs were carried out using L/S ratios of 10, 16.6 and 25 for the two resins in order to determine the capacity of each resin and to choose the best one to use in the column experiments.

As in the case of the cationic resin, the fixed bed experiments were carried out monitoring the breakthrough curves. In this case, Cl⁻ and SO₄²⁻ were studied, as these are the major anions in blood plasma. For these experiments, the same borosilicate glass column (Amicon, Millipore model G32 × 250) was used, the bed height being adjusted to 6 cm, the same pump as in the cationic case also being employed. 60 mL of raw blood plasma were introduced in the column at an upward flow rate of 1.5 mL/min, and samples were taken from the column outlet every 2 min. Once loading was completed, the column was washed with 125 mL of water, distributed in 25 mL in a

Table 1
Characteristics of the (a) Lewatit S-100, (b) Lewatit MP-62 and (c) Lewatit MP-500 resins

	(a)	(b)	(c)
Type	Na Cationic	Free alkali Anionic	Cl ⁻ Anionic
Colour	Amber	Beige	Beige/opaque
Basic matrix	Polystyrene	Reticulated polystyrene	Crosslinked polystyrene
Active groups	Sulphonic	Ternary amine	Quaternary amine, type 1
Granulometry (mm)	0.3–1.25	0.32–1.25	0.47(±0.06)
Apparent density (kg/m ³)	800–900	670	1060
Humidity (weight %)	42–45	50–55	62
Total capacity (mol/L)	2.2	1.7	2
Useful capacity (mol/L)	1.6	1.23	1.4
Thermal stability (°C)	-10 to 120	-20 to 100	-20 to 100
pH stability	1–14	0–14	0–14

first step and 100 mL in a second step. Finally, the resin was regenerated with NaOH 0.5 N during 35 min at the same flow rate as in the loading step, though in the downward sense. Samples were also taken every 2 min.

pH was measured using a Crison micropH 2001 pHmeter and the concentration of F^- , Cl^- , PO_4^{3-} and SO_4^{2-} anions were analyzed using a Dionex 2000 i/spionic chromatograph equipped with an AS4sc column. Protein concentration was analyzed in each sample using the Lowry method (Lowry et al., 1951), and absorbance was measured using a Shimadzu UV 1203 UV-Vis spectrophotometer at 280 nm.

2.2. Demineralization by ultrafiltration

Demineralization by means of the ultrafiltration membrane operation was carried out with a Labscale TFF system (Millipore). This modular system includes a 500 mL acrylic reservoir with an integrated magnetic stirrer and pump. The design of this system allows docking of Millipore's Pellicon XL device directly onto the side of the reservoir. The Pellicon XL device contains membranes with an effective filtration area of 50 cm². As the main plasma proteins presents a molecular weight greater than 30 KDa, the average size of pore chosen was 10 KDa so as to enable filtration of the inorganic ions (permeate solution) while retaining the proteins in the retentate (Fernando, 1981; Kozinski & Lightfoot, 1972; Martinache & Henon, 1988; Wan, Ghost, & Cui, 2002). Specifications for the Pellicon XL device are shown in Table 2.

The process followed consisted in feeding the plasma using a feedback circuit. The filtration process was maintained until the flow was very low. The parameters determined, for both the retentate and permeate, were pH, protein concentration and cation and anion concentrations following the same methods as presented above. After operation, the membranes were washed using 500 mL of NaOH 0.1 N, establishing a working pump pressure of 30 psi. Subsequently, 500 mL of distilled water were pumped through the membrane.

Table 2
Specification for the Pellicon XL Device

Materials of construction	
Membrane biomax basic material	Polyethersulphone
Screens, housing, connectors, luer caps	Polypropylene
Filtration area (cm ²)	50
Dimensions	
Width (cm)	3
Length (cm)	18.8
Hold-up volume (typical) (mL)	3.2
Maximum inlet pressure (psi)	80 at 50 °C
Maximum transmembrane pressure (psig)	40
Recirculation rate (L/min)	0.03–0.05
pH Compatibility	1–14

3. Results

3.1. Characterization of blood and plasma

Physical characterization of blood and plasma was previously carried out in order to determine the main properties that would have an influence on the demineralization process. These properties are shown in Table 3. The composition of general solids and protein is also presented in this table.

The concentrations of the main anions and cations in the plasma were also determined by the experimental methods described above. These concentrations are summarized in Table 3. The major ions are sodium and chlorides, both representing 85% of total ions. The other main cations are potassium and calcium, which present similar concentrations. The second anion in terms of concentration is the sulphate anion, which can determine the behaviour of the demineralization by ion exchange process due to its size and charge.

3.2. Demineralization by ion exchange

3.2.1. Cationic exchange

3.2.1.1. Capacity experiments. The experiments to determine the retention capacity were carried out in batch using the Lewatit S100 resin under the conditions referred to in the experimental section. The experiments comprise a multi-component ion exchange operation, as all the cations are present in the plasma when contact is carried out. Results for the evolution of the sodium concentration versus time after contact are shown in Fig. 2 for two L/S ratios, 6 and 30, respectively, as an example. It can be seen that the kinetics of the process is rapid; equilibrium is reached in around 10 min, with hardly any variation in

Table 3
Characterization of blood and plasma ($T = 20\text{ }^\circ\text{C}$)

	pH	Density (kg/L)	Viscosity (cp)	Solids (%)	Protein (%)
Blood	7.5	1.059	2.90	20	15
Plasma	7.3	1.039	2.33	9.1	9

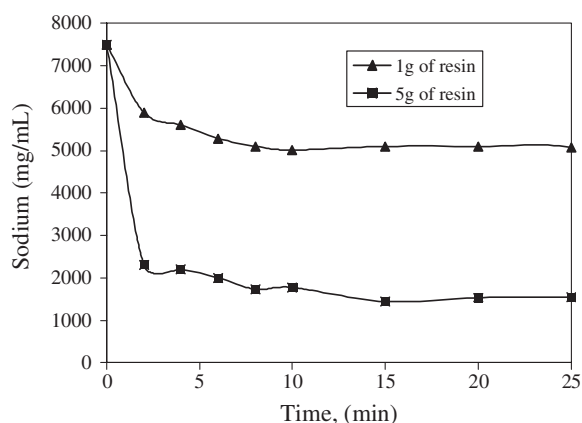


Fig. 2. Na^+ concentration versus time in Lewatit S-100.

the concentration of the ion in solution. Similar times to reach equilibrium were obtained for potassium and calcium.

The total ion exchange capacity for the three cations under study were: 1.81 meq/L resin for calcium, 106 meq/L resin for sodium and 14 meq/L resin for potassium. It should be noted that these values are obtained for complete plasma, i.e. as a multi-component system. Therefore, it is normal for a higher capacity to be found for sodium, as this cation presents the highest concentration in the plasma, as can be seen in Table 4.

3.2.1.2. Column experiments. After the capacity and kinetic experiments in batch runs, breakthrough curves were obtained in the fixed bed columns. From the experimental results for the three major cations, breakthrough times, bed volumes corresponding to each breakthrough time and the useful capacity of the resin were determined. The obtained values are summarized in Table 5. The bed volumes were calculated using Eq. (1), while the useful capacity, q_u , corresponds to the breakthrough time of each breakthrough curve. These experiments were also carried out as a multi-component system, as in the case of the batch runs:

$$bv = \frac{t \text{ (min)} \times F \text{ (mL/min)}}{V \text{ (mL)}} \quad (1)$$

3.2.2. Anionic exchange

3.2.2.1. Capacity experiments. In order to compare both resins (Lewatit MP-62 and Lewatit MP-500), capacity

Table 4
Concentration of the major anions and cations in plasma

Ions	Concentration in plasma (mg/L)
Ca ²⁺	295
K ⁺	200
Na ⁺	7500
F ⁻	65
Cl ⁻	3000
NO ₃ ⁻	75
PO ₄ ³⁻	95
SO ₄ ²⁻	300

Table 5
Experimental parameters of cation exchange

	Breakthrough time (min)	Bed ^a Volumes	q_u (meq cation/L resin)	Co/q_u ^b
Ca ²⁺	65	2.7	1.82	43
Na ⁺	70	2.9	106	24
K ⁺	70	2.9	14	42

^a Bed volumes = ratio of the volume of plasma introduced in the column and the volume of the bed column.

^b Ratio between initial concentration and useful capacity, which indicates the preference of the resin for the anions in the multiphase system, in this case Ca²⁺ > K⁺ > Na⁺.

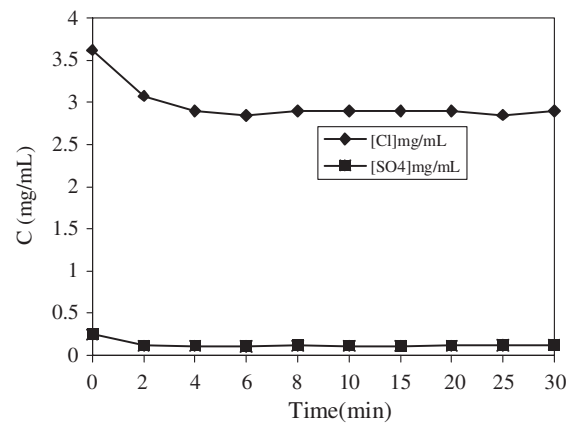


Fig. 3. Sulphate (■) and Chloride (◆) concentration versus time for Lewatit MP-500 resin, L/S = 6.

experiments were carried out in batch under the experimental conditions presented above. Fig. 3 shows the evolution of the concentration of sulphates and chlorides versus time for the resin Lewatit MP-500.

Lewatit MP-62: The capacity results for this resin shows quite effective chloride removal; about 65% of the initial chlorides in solution were retained using an L/S = 10. Percentage retentions of NO₃⁻, HPO₄²⁻ and SO₄²⁻ obtained at this L/S ratio were better than for chlorides due to the higher charges of sulphates and phosphates, which produce a higher affinity for the resin.

Lewatit MP-500: For this resin and an L/S ratio of 50, the chloride concentration in plasma decreased around 10% in 60 min. Using an L/S ratio of 10, the retention of chlorides reaches 75%: In the case of SO₄²⁻, the concentration of this anion decreased almost 50% using an L/S ratio of 50.

Comparing the capacity experiments for the two resins, it can be concluded that Lewatit MP-500 presents a better capacity to retain the chlorides and sulphates contained in blood plasma. Accordingly, only Lewatit MP-500 was tested in the column experiments. The aim of these experiments was to determine the properties of this resin for its possible use as a technique for the removal of anions from plasma. It should be noted that the retention capacity of the resin is highly influenced by the fact that the plasma is a multi-component system from the point of view of cations and anions.

3.2.2.2. Column experiments. Breakthrough curves for chlorides and sulphates in fixed bed experiments were obtained using the Lewatit MP-500 resin. A typical breakthrough curve for chloride is presented in Fig. 4 as an example. All the breakthrough curves obtained presented the same shape, showing a compressive front which is very interesting for the operation, as it is easy to determine the breakthrough time. This time is usually used to design the industrial operation of ion exchange columns.

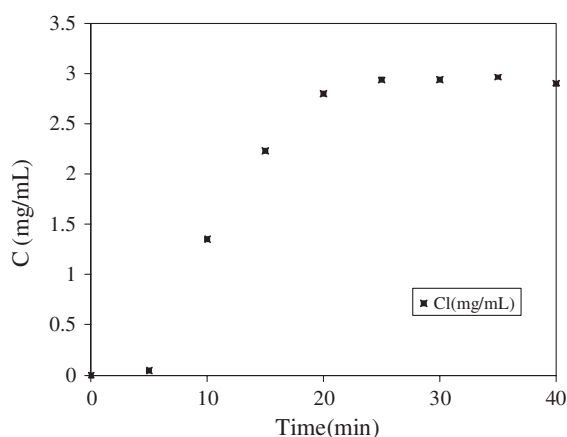


Fig. 4. Breakthrough curve for Chlorides using Lewatit MP-500 resin.

3.3. Demineralization by ultrafiltration

Studies on demineralization of blood plasma using the membrane process were carried out using the equipment and experimental conditions presented in the experimental section. In any membrane process, two solutions are obtained: a permeate and a retentate. The size of the molecules that are retained or filtrated depends of the pore size of the membrane. In the case of blood plasma and using a 10 KDa ultrafiltration membrane, a permeate containing salts and low molecular weight organic compounds and a retentate consisting of a concentrated solution of proteins were obtained. In order to improve the efficiency of the operation, a diafiltration process was carried out with a higher VCF than the value of two. This diafiltration process was carried out adding the same volume of distilled water as the volume of concentrate at that moment.

3.3.1. Retentate analysis

The main goal of the membrane operation is to obtain the maximum reduction of ions in the retentate. In order to express the obtained results, as regards ion concentrations, protein losses or pH evolution of the retentate during the demineralization process, different volumetric concentration factors (VCF) were tested. The VCF is defined as

$$VCF = \frac{\text{mL initial plasma}}{\text{mL retained plasma}} \quad (2)$$

Considering VCF as a design parameter, the variation in concentration of each ion is very similar. The demineralization process using filtration is very different from that of ion exchange. The membrane method involves no selective removal of certain components according to size differences. Fig. 5 shows the decrease in Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- and SO_4^{2-} concentrations in the retentate with increasing VCF values. The concentration of ions refers to the initial volume; the behaviour of the concentration is similar, an important decrease being observed between $VCF = 4$ and $VCF = 8$.

As regards protein concentration, the very slight decrease of the protein concentration in the retentate when

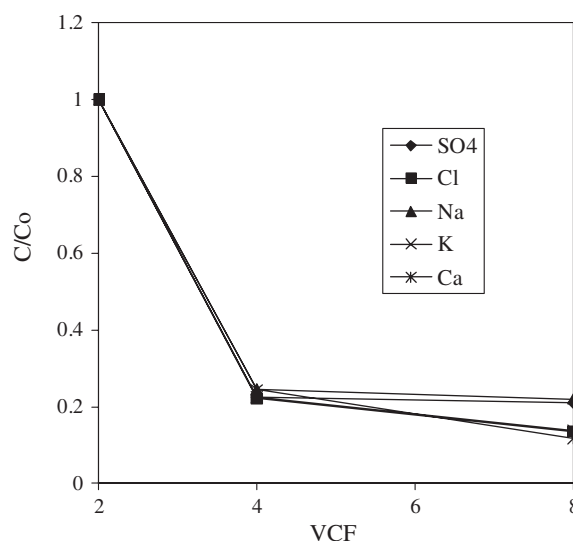


Fig. 5. Concentration of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- and SO_4^{2-} versus VCF.

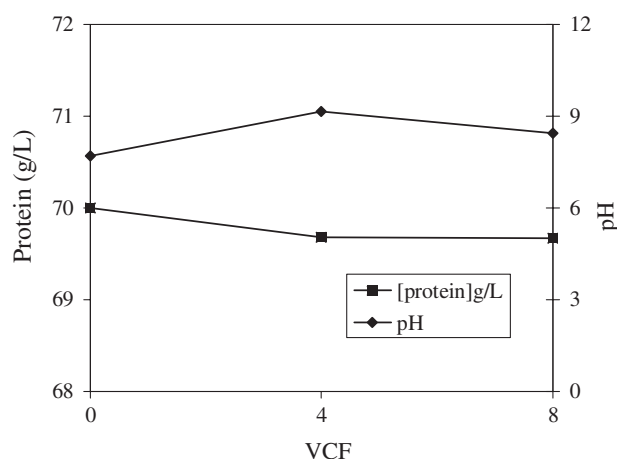


Fig. 6. Protein concentration and pH evolution in the retentate versus VCF.

the VCF increases (Fig. 6) is worth noting. This may be due to an accumulation of solids (principally proteins) on the membrane surface as a consequence of polarization of the membrane produced by the high amount of solid in the fluid. As a result, tangential flow cannot remove the excess of solids: membranes become dirty, filtration speed decreases and the operation has to be interrupted in order to wash the membrane. The main loss of protein in this operation is produced in the polarization of the membrane. The pH of the retentate, on the other hand, does not show a marked change, remaining close to its initial value.

An optimization of the common parameters of interest may be proposed considering minimum protein loss through the membrane versus maximum total ion removal, assuming the same importance for both parameters: the ultrafiltration process shows a good $VCF = 4$ for this operation. Table 6 shows the analysis of initial plasma and demineralized plasma by ultrafiltration, an average demin-

Table 6
Comparison of ion concentration, protein content and pH between raw and ultrafiltered plasma (using VCF = 4).

Plasma	Concentration (mg/L)						Protein (g/L)	pH
	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	F ⁻	Cl ⁻	PO ₄ ³⁻		
Initial							9	7.7
VCF=4 ^a	295	7500	200	65	3000	95	300	9.15
	7	137	20	11	750	15	30	

^a VCF – volumetric concentration factor.

eralization of 80% being achieved. The reduction of each ion respect to the initial concentration presents a similar percentage. The small number of variations may be due to the different affinities of the proteins for the ions.

An important fact in membrane process is the decrease in the permeating flow as the filtration process proceeds. The changes in the permeating flow with filtration time depend on the established feed flow rate fitted and the system pressure. Operating with a flow rate of 16 mL/min and 20 psi, the decrease in the permeating flow is almost lineal, from an initial 3.5 mL/min to 0.30 mL/min at 163 min approximately.

3.3.2. Analysis of the permeate

The permeate is the residual fraction generated. It contains ions, low molecular weight molecules and water which constitutes a waste from the process that has to be eliminated. The concentration of chlorides and sulphates in this solution was monitored during the ultrafiltration process. Fig. 7 shows the evolution of the concentration of these two ions with filtration time. It can be observed that there is hardly any variation with time, i.e. the filtration process removes the same amount of anion even when the membrane begins to be polarized. It should be pointed out that this polarization of the membrane is a reversible process, as it disappears when the membrane is washed.

The presence of protein in the permeate was analyzed in order to determine the loss of protein in this waste solution. An experiment was conducted as the basis for determining

the mass balance. 100 mL of plasma at a concentration of 9 g/L were filtered, the quantity of protein in the sample thus being 0.9 g. After the ultrafiltration operation, results show that the protein concentration in the retentate was 70 g/L, obtaining a final retentate volume of 12 mL. Hence, 0.84 g of protein was retained by the membrane. Finally the protein concentration in the permeate was 0.47 g/L, obtaining a volume of 88 mL, i.e. 0.04 g of protein were lost in the permeate. Determining the mass balance: input: 0.9 g, output: 0.84 + 0.04 = 0.88 g. The amount of protein retained in the pores of the membrane was 0.02 g, which means 2.2% of total protein introduced into the filtration system. The proteins detected in the permeate can be peptides, enzymes or any other low molecular weight proteins that could have passed through the pore diameter of the membrane. The proteins retained in the membrane pores are removed with the washing solution in the cleaning process of the membrane, producing a reversible process as stated above.

The main problem of the permeate solution is its pollutant load. The large amounts of compounds produce COD values of around 10,000 mg O₂/L. When the plasma filtration process finishes, washing of the membranes is necessary. The washing process involves the following stages: first washing with NaOH 0.1 N and then washing with distilled water. The required volumes to complete washing of the membranes in both washing stages are approximately the same as the treated plasma volume. These washing flows have a pollutant load in terms of COD of between 8000 and 10,000 mg O₂/L. This waste, together with the permeate, represents a serious problem for the demineralization process using ultrafiltration, as it must be treated adequately to avoid problems of pollution.

4. Discussion and conclusions

Comparing the two techniques, ion exchange considering the cationic and anionic step sequentially and ultrafiltration with 10 KDa membranes, several aspects may be taken into account when designing an industrial blood plasma demineralization process.

(a) *Removal of ions:* The results of both techniques are very similar. Cationic and anionic exchange achieves a decrease of around 80% for all the inorganic ions present in the plasma, the column operation stopping at the breakthrough point, as this time is considered the operational point.

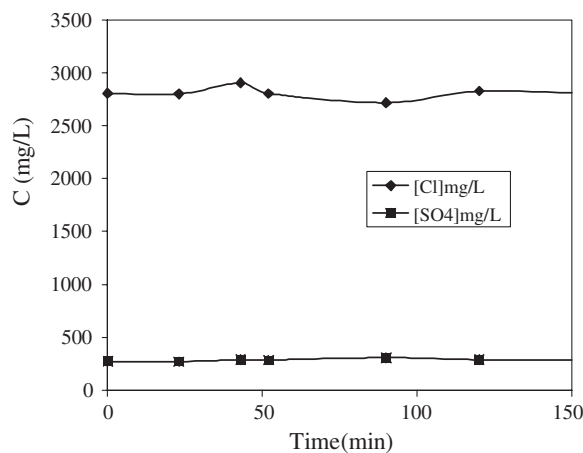


Fig. 7. Chlorides and sulphates concentration in the permeate during ultrafiltration.

Ultrafiltration achieves a reduction of 80% in total ions when the volumetric concentration factor is 4, the optimum VCF found in this case. This result agrees with that obtained by means of ion exchange. However, the removal of low molecular weight organic compounds takes place in ultrafiltration, which would be beneficial for the subsequent purification of the proteins present in the retentate. Only molecules with an electric charge are removed in the ion exchange operation.

(b) *Loss of protein:* A partial protein loss is produced in both operations. It should be borne in mind that blood plasma is a multi-component liquid with more than 100 different proteins. Proteins are very complex molecules capable of undergoing certain transformations on these media, such as hydrolysis, denaturation, precipitation, polymerization, etc, thus complicating their handling.

Around 14% of the total protein in plasma is lost in demineralization by ion exchange when operating at optimal times in each cycle. The most important problem of this technique, as regard proteins, is the pH reached at the time of loading, especially in cation exchange. The structure of some proteins may be altered, with a risk of denaturation in some cases, due to the low pH values.

The protein loss for the optimum VCF is 1% in the ultrafiltration membrane process, which implies a much lower loss than that produced in the ion exchange process. Moreover, the pH is not modified in the case of the membrane operation.

(c) *Regeneration and washing:* Once the loading step is completed, a regeneration step is needed in the ion exchange operation. In the case of the cationic resin, HCl is used. In anion exchange, NaOH is used as the regenerant. For the regeneration step, 0.23 L of HCl 1 N was used for the cationic resin (Lewatit S-100) and 0.25 L of NaOH 0.5 N for the anionic resin (Lewatit MP-500), in both cases per liter of feed plasma.

Once the ultrafiltration operation has finished, a cycle of washing with NaOH and distilled water is needed, using 0.5 L of each solution per 0.5 L of feed plasma.

(d) *Generation of by-products:* In the ion exchange process (cationic and anionic together), a waste volume similar to the feed volume generated in the regeneration step is produced. This residual flow presents a COD of around 1000–1500 mg O₂/L. In the ultrafiltration process, there are two residual flows: the permeate containing the salts and other removed compounds; and the washing effluent, which must be waste. Taking into account these two sources of residual flows, the total waste volume is 1 L per 0.5 L of feed plasma, with a high pollutant load (around 10,000 mg O₂/L).

(e) *Costs of the process:* To analyze the costs of the two techniques, only the laboratory-scale process was studied. A more complete analysis should be carried out considering the process at a pilot-plant scale in order to obtain more accurate costs for a possible industrial operation. The flow chart of a plant process of these operations is shown in Fig. 1. Both processes must use two modules or

sets in order to work continuously, so that while one is loading, the other one is regenerating or washing.

As regards equipment costs, the price of the Labscale TFF system is around \$6000 and the described resins around \$4–6/L. With respect to the costs of waste treatment, the volume of residual flow generated in ultrafiltration is approximately twofold that generated in ion exchange, producing higher COD values than those of ion exchange waste. Hence, a higher cost must be considered for purification treatments using the membrane process. Regarding processing time, the loading, washing and regeneration process in ion exchange is slower than in ultrafiltration, which could reduce process costs with respect to the production of treated plasma or the time taken for each cycle. These points should be taken into account in the implementation of the demineralization process at a pilot-plant scale. As the operability of the ultrafiltration membranes is better for treating high volumes of plasma, the initial demineralization may be carried out using this technique. However, ion exchange may be used if a more intense demineralization is needed (for special uses), as this technique is more specific for the removal of ions.

In conclusion, two demineralization techniques were tested and compared for demineralizing animal blood plasma. Ion exchange was first carried out using a cationic resin, Lewatit S-100, and then an anionic resin, Lewatit MP-500. The results show good retention capacities for the major cations and anions in the plasma. The main problems detected for the ion exchange operation were the important protein loss found during the operation and the variations in pH at the outlet of the columns, which may lead to important changes in the configuration of the proteins. The ultrafiltration operation using a membrane with a 10 KDa pore size also showed good removal of the major ions in the plasma in the permeate, with low protein loss and no variations in pH. The main problem of this technique is the large amounts of waste effluent generated and the high COD of this effluent. For a pilot plant of industrial operation, membranes are more suitable for treating high volumes of plasma, but if very exhaustive demineralization is required, ion exchange is more appropriate.

References

- Cheryan, M. (1986). *Ultrafiltration Handbook*. Pennsylvania: Technomic Pub. Co. Inc..
- Deutscher, M. P. (1990). *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology*. USA: MBG Cornell, pp. 182, 183.
- Fernando, T. (1981). Concentration of animal blood by ultrafiltration. *Biotechnology & Bioengineering*, 23, 19.
- Ghost, R. (2001). Fractionating of biological macromolecules using carrier phase ultrafiltration. *Biotechnology & Bioengineering*, 74, 1–11.
- Ghost, R., & Cui, Z. F. (1998). Fractionation of BSA and lysozyme using ultrafiltration: Effect of pH and membrane pre-treatment. *Journal of Membrane Science*, 139, 17–28.
- Ghost, R., & Cui, Z. F. (2000). Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. *Journal of Membrane Science*, 167, 47–53.

- Goldsmith, R., & de Filippi, R. P. (1971). *Industrial Ultrafiltration In Membrane Processes in Industry and Biomedicine*. London: Ed Plenum Press.
- Gras, J. (1983). *Plasma Proteins*. Barcelona, Spain: Ed. Lims.
- Harris, E. R. V. (1989). *Protein purification methods: a practical approach*. Oxford: Oxford University.
- Khan, D. W., Bulter, M. D., Cohen, D. L., Gordon, M., Khan, J. W., & Winkler, M. E. (2000). Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration. *Biotechnology & Bioengineering*, 69, 101–106.
- Kozinski, A. A., & Lightfoot, E. N. (1972). Protein ultrafiltration: a general example of boundary layer filtration. *AIChE Journal*, 18(5), 1040.
- Linden, G., & Lorient, D. (1994). *Biochimie-Agroindustrielle*. Paris: Manson.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Martinache, L., & Henon, M. P. (1988). Concentration and desalting by ultrafiltration. In J. M. Curling (Ed.), *Methods of Plasma Protein Fractionation*. London, UK: Academic Press.
- Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. (2000). *Animal By-Product Processing and Utilization*. Florida, USA: CRC Press.
- Rendueles, M., Moure, F., Fernández, A., & Díaz, M. (1996). Preliminary studies on the processing of slaughterhouse blood for protein recovery. *Resources and Environmental Biotechnology*, 1, 193–206.
- Simon, A., Vandanjon, L., Levesque & Bourseau, P. (2002). Concentration and desalination of fish gelatin by ultrafiltration and continuous diafiltration processes. *Desalination*, 144, 313–318.
- USDA reports. <http://usda.mannlib.cornell.edu/reports/nassr/livestock/zma-bb/> visited October 2005.
- Wan, Y., Ghost, R., & Cui, Z. (2002). High resolution plasma protein fractionation using ultrafiltration. *Desalination*, 144, 301–306.

CAPÍTULO 4:
PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DESMINERALIZADAS

La desmineralización del plasma puede afectar a las propiedades funcionales de las proteínas que contiene. Esto puede ser limitante a la hora de adicionar esas proteínas a diversos productos alimenticios, ya que las propiedades funcionales no sólo afectan a las características organolépticas de los alimentos sino que también pueden condicionar su comportamiento físico durante su preparación, transformación o almacenamiento.

Este capítulo incluye tres artículos. En el primero se muestra cómo la desmineralización repercute en la desnaturalización de las proteínas plasmáticas. En el segundo se analizan las propiedades funcionales de los residuos proteicos desmineralizados y, en el tercero, se evalúa la posibilidad de recuperar la conformación nativa de proteínas alimentarias a través de un proceso de renaturalización.

Determinación por viscosimetría de la desnaturalización de proteínas sometidas a operaciones de desmineralización

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz *

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, Facultad de Química, C/Julián Clavería s/n, 33071 Oviedo, España

*Autor correspondiente. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.
Dirección de correo electrónico: mariodiaz@uniovi.es (M. Díaz)

Resumen

Numerosos residuos procedentes de la industria alimentaria son susceptibles de ser recuperados por su alto contenido proteico. Un ejemplo de ello lo constituye el plasma porcino, que es uno de los sub-productos de la industria cárnica más valorados por sus excelentes propiedades funcionales. Las proteínas plasmáticas pueden ser aisladas e incorporadas a multitud de productos alimenticios. Sin embargo, para llevar a cabo esta purificación y separación es necesario eliminar diferentes compuestos, especialmente los iones y las sales que contiene el plasma sin tratar. En este trabajo el plasma desmineralizado por las dos técnicas más comúnmente usadas en la industria alimentaria, el intercambio iónico y la ultrafiltración, fue analizado para cuantificar la desnaturalización sufrida por sus proteínas. Para lograr este objetivo se utilizó una técnica de viscosimetría que ha permitido comparar las modificaciones en la conformación de las proteínas del plasma sin tratar y sometido a procesos de desmineralización (intercambio iónico y ultrafiltración). Así mismo se ha evaluado la desnaturalización provocada por las técnicas de desmineralización ensayadas en muestras de lactosuero. Los resultados mostraron que el tratamiento de intercambio iónico provocó un mayor grado de desnaturalización que el de ultrafiltración. Además el proceso de intercambio iónico produjo un acusado descenso del pH, lo que desencadenó en las proteínas fuertes repulsiones electrostáticas.

Palabras clave: plasma, proteínas, desnaturalización, desmineralización.

1. Introducción

La sangre procedente de los mataderos puede considerarse como uno de los residuos más problemáticos de la industria cárnica debido a la gran cantidad que se genera y a su alto poder contaminante (Ockerman et al. 2000, Rendueles y cols., 1996). La eliminación de estos residuos constituye, por un lado, un importante coste añadido al proceso de producción y, por otro, perjudica enormemente el funcionamiento de las depuradoras. Una solución a este problema

sería la posibilidad de incorporar la sangre procedente de mataderos a productos alimenticios (Harris, 1989), de manera que la industria alimentaria podría usar proteínas procedentes de la sangre para adicionarlas a productos dietéticos o de imitación.

Para llevar a cabo la separación y purificación de las proteínas sanguíneas es necesario separar el plasma (Harris, 1989), fracción líquida de la sangre, de la fracción celular. El plasma está constituido básicamente por proteínas (7%), agua (91%) y una gran variedad de sales y compuestos de bajo peso molecular (1%). Las proteínas del plasma son básicamente todas las que existen en la sangre, excepto la hemoglobina, que es la proteína mayoritaria de la fracción celular (Gras, 1983). Antes de realizar la purificación de las proteínas es necesario eliminar las impurezas, especialmente los iones y sales que contiene el plasma crudo. La separación previa de todos estos componentes del plasma puede mejorar el proceso final de separación y purificación de proteínas. Así mismo, la eliminación de los componentes minerales se hace necesaria si las proteínas van a ser destinadas para alimentación humana como helados, pasteles, pan, etc. (Goldsmith y cols., 1971).

Las técnicas existentes hoy en día para llevar a cabo la eliminación de los componentes inorgánicos del plasma sanguíneo son el intercambio iónico, los procesos de membranas y los procesos de secado, bien el secado tradicional y/o el secado por atomización. En este trabajo se han utilizado dos de ellas, el intercambio iónico y la ultrafiltración (Del Hoyo y cols., 2007), ya que los procesos de secado son válidos cuando el producto se va a utilizar directamente y no como etapa previa para una separación y purificación posterior (Real del Sol y cols., 1991). Los intercambiadores iónicos son matrices sólidas que contienen sitios activos (también llamados grupos ionogénicos) con carga electrostática, positiva o negativa, neutralizada por un ión de carga opuesta (contraión). En estos sitios activos tiene lugar el proceso de intercambio iónico. Por su parte, la filtración es la separación de partículas sólidas a partir de un fluido haciendo pasar éste a través de un medio filtrante, en este caso membranas, sobre el que se depositan los sólidos.

Ambas técnicas de desmineralización pueden contribuir a la desnaturalización de las proteínas presentes en el plasma. La desnaturalización de las proteínas puede medirse por su constante de sedimentación en una ultracentrífuga, viscosidad, emigración en un campo eléctrico (electroforesis), dispersión óptica rotatoria, propiedades termodinámicas (calorimetría diferencial), propiedades biológicas e inmunológicas, reactividad de algunos grupos funcionales o por dicroísmo circular (Privalov y cols., 1989). La conformación de una proteína basada en

sus estructuras secundaria y terciaria es frágil. Por ello, el tratamiento de las proteínas por los ácidos, bases, soluciones salinas concentradas, disolventes, calor, radiaciones, etc., puede modificar de una forma más o menos importante estas estructuras.

La desnaturalización proteica puede definirse como cualquier modificación de su conformación (a nivel de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria) que no vaya acompañada de la ruptura de los enlaces peptídicos implicados en la estructura primaria. La desnaturalización es un fenómeno complejo durante el cual aparecen conformaciones nuevas, frecuentemente fugaces y efímeras (Lehninger, 1978). El estado final de la desnaturalización puede corresponder a una estructura polipeptídica, totalmente desplegada (unfolded), en la que son transitorias las interacciones intraproteicas y proteínas disolventes (Figura 1). Sin embargo, un aumento del nivel de estructura, por encima del nivel de la estructura natural, también debe considerarse como una forma de desnaturalización. Algunas proteínas ya están en su forma natural desplegadas (monómeros de algunas caseínas) lo que explica su estabilidad frente a determinados agentes desnaturalizantes, como por ejemplo el calor.

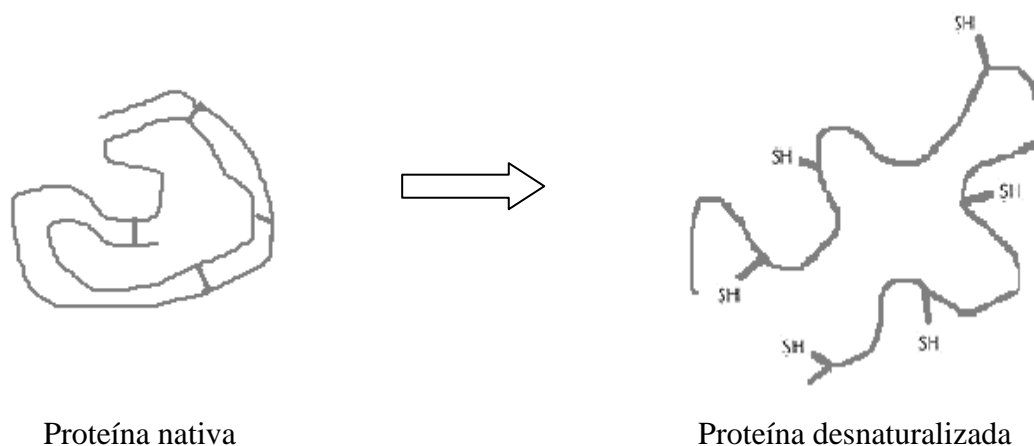


Figura 1. Esquema del proceso de desnaturalización de una proteína.

Los efectos de la desnaturalización son numerosos y entre ellos conviene citar el descenso de la solubilidad resultado del desbloqueo de grupos hidrófobos, la alteración de la capacidad de fijación de agua, la pérdida de actividad biológica (por ejemplo enzimática o/y inmunológica), el aumento de la sensibilidad al ataque de las proteasas (debido al desbloqueo de enlaces peptídicos correspondientes a los sitios de acción específica de las proteasa), el aumento de la viscosidad

intrínseca, o incluso, su incapacidad a la cristalización. La sensibilidad de una proteína a la desnaturalización está en función de la velocidad con la cual el agente desnaturalizante rompe las interacciones o enlaces que establecen las estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias. Como estas estructuras varían de una proteína a otra, los efectos de los agentes desnaturalizantes van a depender de la proteína.

El objetivo de este trabajo es determinar si las técnicas de desmineralización ensayadas provocan la desnaturalización de diversas proteínas alimentarias (plasma sanguíneo y lactosuero). Así mismo se probará la validez de la viscosimetría como método para determinar la desnaturalización sufrida por las proteínas.

2. Materiales y métodos

2.1. Plasma

La sangre empleada en este trabajo ha sido de procedencia bovina proveniente del Matadero Central de Asturias Junquera-Bobes (Noreña). La sangre se recogió en un recipiente al que rápidamente se añadió el anticoagulante citrato de sodio (Panreac) en una concentración 1% v/v. Ya en el laboratorio la sangre fue centrifugada a 10000xg durante 10 minutos para separar el plasma (60% del volumen total) de la fracción celular (40%). Para ello se utilizó una centrífuga Kubota 6700 y se emplearon tubos de 250 mL. El plasma obtenido por este procedimiento se mantuvo a 4 ° C.

2.2. Lactosuero

El suero ácido fue obtenido a partir de leche de vaca natural que no sufrió ningún tipo de tratamiento. Se ajustó el pH (usando un pHmetro Crisol, micropH 2001) a 4.65 utilizando HCl 1N, seguido del tratamiento térmico a 37° C durante 2 horas. A continuación la preparación se centrifugó a 5000 xg durante 3 minutos en una centrífuga Kubota 6700, obteniendo así el lactosuero.

2.3. Desmineralización del plasma y del lactosuero

Para eliminar las componentes minerales que contiene el plasma y el lactosuero (Tablas 1 y 2) se han utilizado dos técnicas de desmineralización, cuya comparación ya ha sido realizada anteriormente (Del Hoyo y cols., 2007).

Tabla 1. Composición mineral del plasma sanguíneo

Valor medio en 100 mL		
Cationes	Calcio	10-12 mg
	Potasio	18-20 mg
	Magnesio	1.3-3.5 mg
	Hierro	0.9-1.2 mg
	Cobre	1-1.4 mg
	Sodio	300-350 mg
Aniones	Cloruros	340-380 mg
	Carbonatos	150-170 mg
	Fosfatos	12-15 mg
	Sulfatos	3-5 mg
	Bromuro	0.8-1.8 mg
	Yoduro	0.8-1.3 mg

Tabla 2. Composición mineral del lactosuero (Almenara y cols., 2007)

Valores medios (mg/ L)							
Fosfatos	Sodio	Potasio	Calcio	Magnesio	Hierro	Cobre	Zinc
425	666	1384	339	94	0.12	0.03	0.12

2.3.1. Desmineralización por intercambio iónico

Las muestras de plasma y lactosuero fueron sometidas a intercambio catiónico y aniónico. Para llevar a cabo la eliminación de los cationes presentes en ambos subproductos alimentarios se utilizó la resina de catión ácido fuerte Lewatit S-100 (Lanxess Chemicals), mientras que para eliminar los aniones se emplearon 2 resinas de anión básicas fuertes: Lewatit MP-62 y MP-500 (Lanxess Chemicals).

a. Intercambio catiónico

Para determinar la capacidad de retención de la resina, 30 mL de plasma sanguíneo y lactosuero sin tratar fueron añadidos a 1 g de resina ($L/S = 30$). Se tomaron muestras a diferentes tiempos entre 0 y 60 minutos, lo que permitió obtener la cinética del proceso, es decir, la variación de la concentración de iones del plasma (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}) con el tiempo. El contacto se llevó a cabo en un tanque agitado de 100 mL de volumen.

Posteriormente se realizaron las curvas de ruptura de los tres cationes mayoritarios del plasma y del lactosuero. Para lo cual se utilizó una columna de vidrio de borosilicato (Amicon, Millipore, modelo G32x250) de 32 mm de diámetro y una altura de lecho de 120 mm, ayudada de una bomba peristáltica (Masterflex, modelo 7554-60) provista de tubos de silicona (modelo 96400-16) que impulsaba la alimentación en sentido ascendente. Durante el experimento se bombearon 400 mL de plasma y lactosuero a través de la columna a un flujo medio de 2.5 mL /min, tomando muestra cada 5 minutos durante 3.5 horas. A continuación, se llevó a cabo un lavado con agua destilada para eliminar el plasma y lactosuero retenidos en los poros de la columna y determinar la porosidad del lecho. Se recogieron 2 fracciones del agua de lavado: una de 100 mL, y la otra de 500 mL. La regeneración de la columna fue realizada con HCl 1N (Merck), durante 35 minutos, tomando muestra cada 5 minutos y manteniendo el mismo flujo medio que en el periodo de carga, pero en este caso la solución de regeneración fue impulsada en sentido descendente.

Para cada muestra, tanto en el periodo de carga como en el de elución, se determinó: el pH, la concentración de los cationes mayoritarios (Na^+ , K^+ y Ca^{2+}), la concentración de proteína y la medida de la absorbancia a 280 nm.

b. Intercambio aniónico

Para cada resina, 50 mL de plasma sanguíneo y lactosuero sin tratar fueron añadidos a 1 g de resina ($L/S = 50$) en tanques agitados de 100 mL de volumen, tomando muestra a diferentes tiempos entre 0 y 60 minutos. Este tiempo fue suficiente para alcanzar el equilibrio. Para ambas resinas se realizaron varias pruebas utilizando proporciones L/S de 10, 16.5 y 25 con el objeto de determinar la capacidad de cada resina y escoger la más adecuada para llevar a cabo los experimentos en columna.

Para estudiar la operación de desmineralización, se hicieron medidas de los aniones mayoritarios del plasma, en este caso Cl^- y SO_4^{2-} , y se obtuvieron las respectivas curvas de

ruptura. Se utilizó la misma columna de vidrio de borosilicato (Amicon, Millipore, modelo G32x250), ajustada a una altura de lecho de 60 mm, y la misma bomba peristáltica que en el intercambio catiónico. Durante el experimento se bombearon 60 mL de plasma sanguíneo y lactosuero a un flujo medio de 1.5 mL /min en sentido ascendente, tomando muestras cada 2 minutos. Una vez finalizado el periodo de carga, la columna fue lavada con 125 mL de agua destilada, 25 mL en un primer paso y 100 mL en el segundo. Finalmente, la regeneración fue realizada con NaOH 0.5N durante 35 minutos al mismo flujo que en el periodo de carga, pero en sentido descendente. Las muestras fueron tomadas igualmente cada 2 minutos.

Para cada muestra, tanto en el periodo de carga como en el de elución, se determinó: el pH, la concentración de F^- , Cl^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} y la concentración de proteína medida a 280 nm.

2.3.2. Desmineralización por ultrafiltración

Para llevar a cabo la desmineralización por ultrafiltración se empleó una membrana de ultrafiltración Labscale TFF system (Millipore). Este sistema modular incluye un reservorio acrílico de 500 mL, un agitador magnético integral y una bomba. El diseño de este sistema permite que el dispositivo Millipore Pellicon XL se intercale directamente en un lado del reservorio. El aparato Pellicon XL contiene membranas con un área de filtración efectiva de 0.005 m^2 . Teniendo en cuenta que las principales proteínas plasmáticas y del lactosuero presentan un peso molecular mayor de 30 KDa, se ha escogido un tamaño medio de poro de 10 KDa, para permitir la filtración de iones inorgánicos (solución de permeado) reteniendo las proteínas en el retenido (Wan y cols., 2002; Kozinski y cols., 1972; Martinache y cols., 1988; De Vouno y cols., 1975).

Para llevar a cabo la desmineralización se realizó la filtración de plasma usando un circuito de retroalimentación. El proceso de filtración fue mantenido hasta que el flujo era muy bajo. Los parámetros determinados, para el permeado y para el retenido, fueron el pH, la concentración de proteína y la concentración de cationes y de aniones. Tras la operación, las membranas se lavaron usando 500 mL de NaOH 1N, fijando la presión de trabajo de la bomba a 30 psi. Posteriormente, se bombearon 500 mL de agua destilada a través de la membrana.

Para expresar los resultados se ha hallado el factor de concentración volumétrica (VCF) del retenido referente a la concentración de iones, pérdidas de proteína o evolución del pH. El factor de concentración volumétrica se define como:

$$\text{VCF} = \frac{\text{ml de plasma inicial}}{\text{ml de plasma retenido}} \quad (1)$$

2.4. *Determinación de la desnaturalización proteica*

La evaluación de la desnaturalización sufrida por las muestras de plasma y de lactosuero desmineralizadas se realizó mediante viscosimetría (Anson y Mirsky, 1932). Para ello se empleó un viscosímetro rotacional Brookfield DV-III, manteniéndose las condiciones de temperatura y velocidad de giro durante todo el experimento (25 °C y 250 rpm).

3. Resultados y discusión

El plasma sanguíneo y el lactosuero fueron sometidos a un proceso de desmineralización utilizando las técnicas descritas en la metodología.

3.1. *Desmineralización del plasma sanguíneo*

a. Intercambio iónico

Los resultados obtenidos para ambas técnicas son bastante similares, ya que ambos casos se ha logrado un descenso del 80% de los iones inorgánicos presentes en el plasma. En la Figura 2 se muestra la variación de la concentración de los iones mayoritarios del plasma sanguíneo en el tiempo utilizando una resina de intercambio iónico.

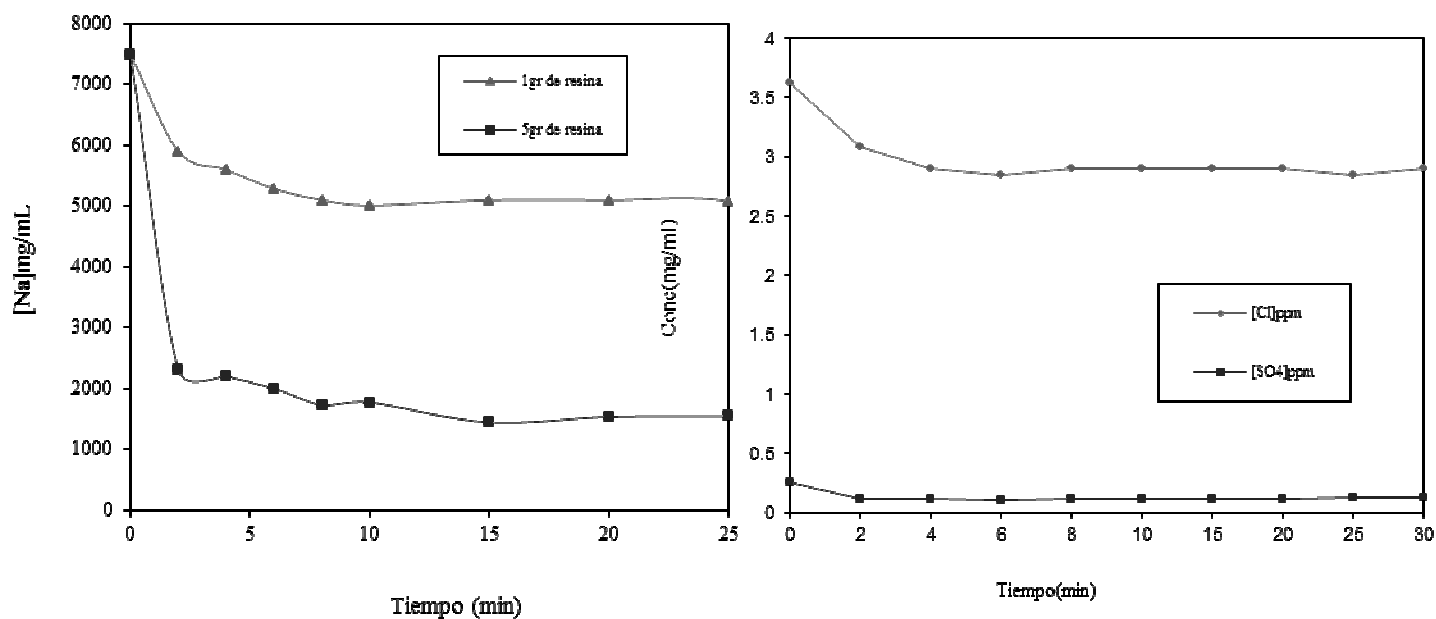


Fig. 2. Variación de la concentración de los iones mayoritarios del plasma sanguíneo en el tiempo utilizando resinas de intercambio iónico. (a) Variación de sodio en el tiempo usando una resina Lewatit S-100. (b) Variación de cloruros y sulfatos en el tiempo usando una resina Lewatit MP-500.

b. Ultrafiltración

Considerando el VCF como un parámetro del diseño, la variación de la concentración es muy similar. El método de membrana conlleva la eliminación no selectiva de ciertos componentes según su tamaño. La Figura 3 muestra un descenso en la concentración de iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , Cl^- y SO_4^{2-} en el retenido cuando se incrementan los valores de VCF. Las concentraciones de iones han sido analizadas diluyendo las muestras con agua destilada hasta alcanzar el volumen inicial. Todos los iones presentan un comportamiento similar, con un importante descenso entre VCF de 4 y 8.

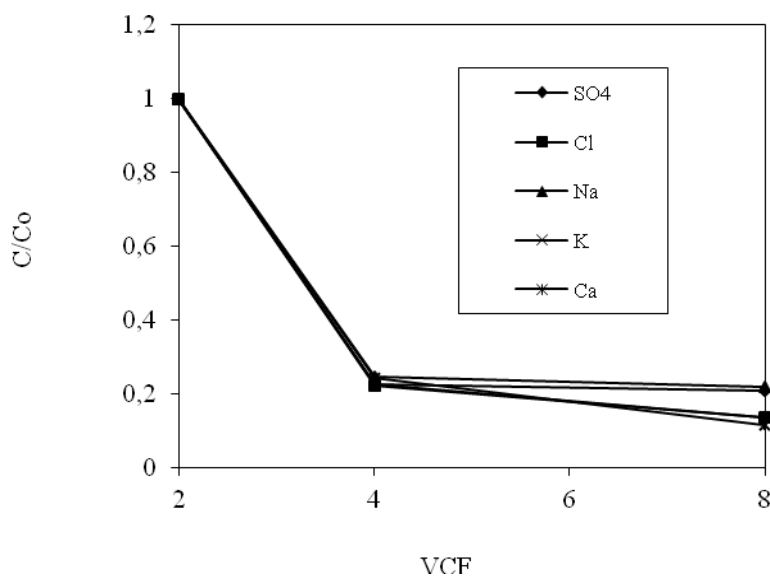


Fig. 3 Variación de la concentración de los principales iones del plasma sanguíneo frente a VCF utilizando una técnica de ultrafiltración.

El proceso de ultrafiltración muestra que se obtienen buenos resultados para VCF de 4. La Tabla 3 muestra el análisis del plasma inicial y del plasma desmineralizado por ultrafiltración observándose que se alcanza una desmineralización del 80% aproximadamente. La reducción de la concentración de cada ión es proporcional respecto a la inicial. Las escasas variaciones pueden ser debidas a las diferentes afinidades de las proteínas por los iones.

Tabla 3. Comparación de la concentración de iones, del contenido proteico y del pH entre plasma sin tratar y plasma ultrafiltrado (usando VCF =4)

Plasma	Conc. (mg/l)							Proteína (g/L)	pH
	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	F ⁻	Cl ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻		
Inicial	295	7500	200	65	3700	95	300	70	7.7
(*)VCF=4	7	137	20	11	750	15	30	69	9.15

- Factor de concentración volumétrica, VCF=mL de plasma inicial/ mL de plasma retenido después de la filtración.

En el proceso de desmineralización por intercambio iónico se produjo una pérdida del 14% de las proteínas totales del plasma (Tabla 4), mientras que en el proceso de desmineralización por ultrafiltración se produjo una pérdida de tan sólo el 1% (Fig. 4). Sin embargo, el mayor problema que plantea el uso de técnicas de intercambio iónico es la modificación del pH que ocurre en el momento de la carga, especialmente en el intercambio catiónico, como se puede apreciar en la tabla 1, lo que puede producir la desnaturalización de algunas de las proteínas presentes en el plasma (Del Hoyo y cols., 2007).

Tabla 4. Pérdida de proteínas y variación del pH durante el tratamiento de intercambio iónico

	Proteína (g/L)	pH
Plasma sin tratar	70	7.73
Plasma sometido a intercambio catiónico	60.2	3.67
Plasma sometido a intercambio aniónico	58.9	11.98

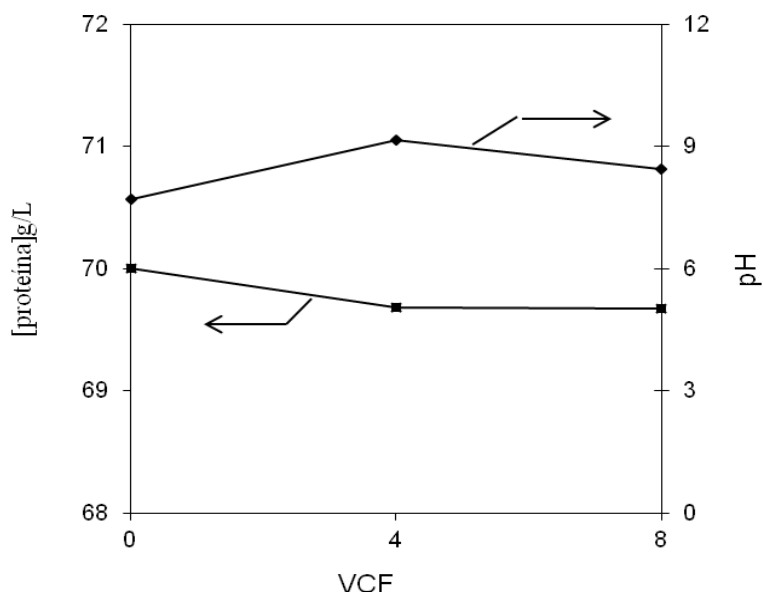


Fig 4. Pérdida de proteínas y variación del pH durante el tratamiento de ultrafiltración.

3.2. Desmineralización del suero lácteo

Los resultados obtenidos en los procesos de desmineralización del suero lácteo, llevados a cabo en las mismas condiciones experimentales que el plasma sanguíneo, fueron muy similares en cuanto al grado de desmineralización alcanzado. En el proceso de intercambio catiónico y aniónico en conjunto se alcanzaron niveles cercanos al 80 % en la eliminación de cationes y aniones, mientras que el caso de la ultrafiltración para VCF=4 se alcanzaron también niveles de desmineralización similares a los del plasma sanguíneo.

3.3. Desnaturalización de las proteínas del plasma y del lactosuero desmineralizadas

Una vez analizada la eficacia de ambos procesos se llevó a cabo el estudio de la desnaturalización que sufren las proteínas desmineralizadas.

Siguiendo el método experimental referido en el apartado de metodología, se determinó la desnaturalización sufrida por las proteínas del plasma sanguíneo y del lactosuero mediante viscosimetría.

En las Figuras 5 y 6 se muestran los resultados obtenidos para las muestras de plasma sanguíneo y de lactosuero respectivamente. En el caso del plasma se observa una gran variación del valor de la viscosidad ya que existe una diferencia de casi 8 cp entre las muestras de plasma sin tratar y descationizado. En cambio, para el lactosuero, la variación en el valor de la viscosidad no es mayor de 0.5 cP.

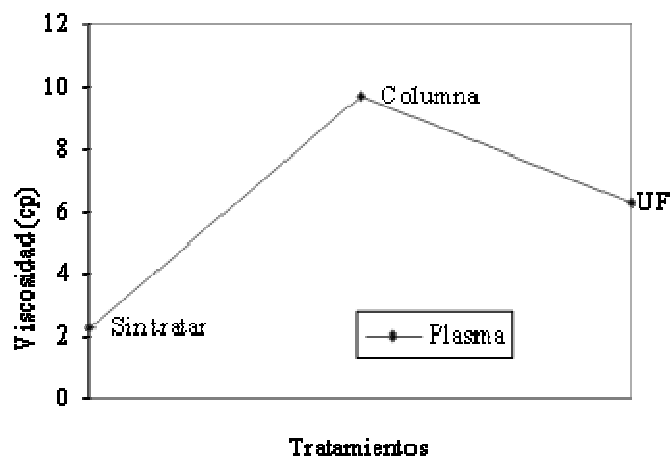


Fig. 5. Variación de la viscosidad de muestras de plasma sanguíneo sometidas a distintos procesos de desmineralización.

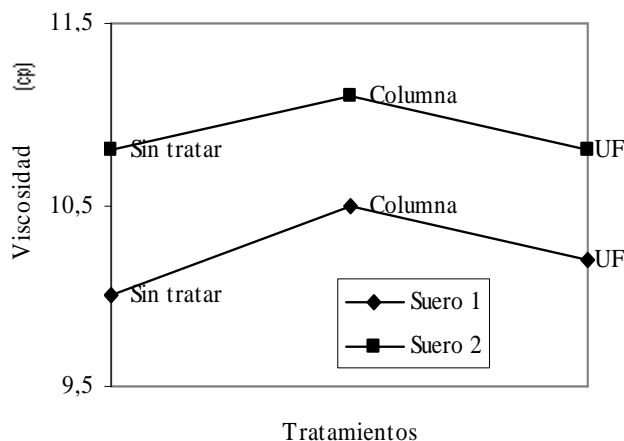


Fig. 6. Variación de la viscosidad de muestras de lactosuero sometidas a distintos procesos de desmineralización.

Teniendo en cuenta que un aumento del valor de la viscosidad se asocia a un mayor grado de desnaturalización, los resultados muestran que los tratamientos de desmineralización provocan un incremento de la viscosidad de las muestras y, por tanto, una mayor desnaturalización de las proteínas que las constituyen.

La causa de la baja variación de la viscosidad para el caso del lactosuero desmineralizado respecto al lactosuero ácido sin tratar puede encontrarse en el proceso utilizado para obtener el lactosuero, ya que se hizo por coagulación ácida y este tratamiento produce una cierta desnaturalización de las proteínas séricas, contribuyendo los procesos de desmineralización a aumentar ligeramente la desnaturalización de las proteínas. En el caso del plasma sanguíneo este se obtuvo por centrifugación directa de la sangre, el cual es un proceso menos desnaturalizante que la coagulación ácida, por esto el efecto de los procesos de desmineralización en este producto es mucho más marcado.

Al comparar ambas técnicas de desmineralización, se puede observar que durante el proceso de intercambio iónico se produce un mayor grado de desnaturalización que durante la ultrafiltración. Esto puede ser debido a que durante el tratamiento de intercambio iónico se produce un acusado descenso en el pH (tal y como se muestra en la Tabla 5). Con estos valores extremos de pH, se producen en las moléculas fuertes repulsiones electrostáticas de los grupos iónicos, lo que favorece el desdoblamiento (desnaturalización) de las proteínas constituyentes de las muestras y, por tanto, un aumento de la viscosidad de las mismas.

Tabla 5. Valores de pH de muestras sometidas a distintos procesos de desmineralización

		pH	
Plasma sanguíneo		Suero lácteo	
		Suero 1	Suero 2
Natural	7.73	4.6	4.78
Inter. iónico	3.67	1.28	1.65
UF	9.15	5.11	5.87

4. Conclusiones

Se ha mostrado que la viscosimetría es una técnica válida para determinar la desnaturalización que pueden sufrir las proteínas sometidas a procesos de desmineralización, para ello es necesario conocer la viscosidad del material antes de tratar, comprobándose su aumento al llevarse a cabo los procesos de desmineralización. Los resultados han demostrado que la desnaturalización sufrida por las proteínas sometidas a ambos tratamientos es mayor con la técnica de intercambio iónico que con la de ultrafiltración, tanto en las muestras de plasma como en las de lactosuero. Una de las razones del mayor efecto desnaturalizante de los procesos de intercambio iónico cabe encontrarlo en las acusadas variaciones del pH, tanto en el intercambio catiónico como aniónico que produce fuertes repulsiones electrostáticas en las proteínas que tienden a romper los enlaces que constituyen la estructura terciaria de las proteínas.

5. Referencias

1. Almenara, F.J, Álvarez, S., Darias, J., Rodríguez, E., Díaz, C. y Fresno, M. Efecto de la maduración en la composición de los quesos de cabra majorera. Arch. Zootec., (2007), 56 (Sup. 1): 667-671.
2. Anson, M.L. and Mirsky A.E. "The effect of denaturation on the viscosity of protein systems". The Rockefeller Institute for Medical Research, (1932), 15 (3), 341-350.
3. Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M., and Díaz, M. " Desmineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration". Meat Science, 76 (2007), 402-410.
4. De Vouno M., Penteadó C., Lajolo F.M. and Dos Santos P., "Functional and nutritional of isolated bovine blood protein", J. Sci. Food Agric., (1975), 30, 8, 809-815.

5. Gras, J., "Plasma Proteins", Ed. Lims, Barcelona (Spain), (1983).
6. Goldsmith, R., De Filippi, R.P., "Industrial Ultrafiltration In Membrane Processes in Industry and Biomedicine", Ed. Plenum Press, London, (1971).
7. Harris, E.R.V., "Protein purification methods: a practical approach", Oxford University, Oxford, (1989).
8. Kozinski, A.A., Lightfoot, E.N., Protein ultrafiltration. "General example of boundary layer filtration", American Institute of Chemical Engineers, (1972), 18, 5, 1040.
9. Lehninger, A.L., "Bioquímica". Ed. Omega, (1978), 121-141.
10. Martinache, L., Henon, M.P., Curling, J.M., "Concentration and desalting by ultrafiltration. In Methods of Plasma Protein Fractionation", Ed. Academic Press, London, U.K., (1988).
11. Ockerman, H.W., Hansen, C.L., "Animal By-Product Processing and Utilization", CRC Press, Florida (USA), (2000).
12. Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov S.Yu, Griko, YuV., Makhatadze, G.I., Khechinashvili, N.N. "Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state". Journal of Molecular Biology, (1989), 737-750.
13. Real del Sol, E., Martin Yero, M., "Empleo de la Ultrafiltración en la Obtención de Concentrados del Plasma Sanguíneo", Alimentaria, (1991), 228, 21-23.
14. Rendueles, M., Moure, F., Fernández, A., Díaz, M., "Preliminary studies on the processing of slaughter-house blood for protein recovery", Resource Environ. Biotechnol., (1996), 1, 193-206.
15. Wan, Y., Ghos,R., Zhanfeng, C., "High-resolution ultrafiltration processes for protein fractionation" ,Desalination, (2002), 144, 301-306.

Effect of processing on functional properties of animal blood plasma

P. Del Hoyo, M. Rendueles, M. Díaz *

Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Oviedo, C/Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

Received 27 May 2007; received in revised form 14 July 2007; accepted 16 July 2007

Abstract

A number of functional and physical properties such as solubility, foam capacity, emulsifying stability and interfacial tension were compared for standard plasma, plasma decationed by ion exchange and plasma deionized by ultrafiltration (UF). The changes in functional properties can determine the use of a protein as an additive to a food product or invalidate its use. All samples had good functional properties and hence could be used in the formulation of food products. Results showed that ion exchange and UF improved emulsifying capacity while having little effect on the other functional properties.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Plasma proteins; Functional properties; Ion exchange; Ultrafiltration

1. Introduction

Animal blood produced in slaughterhouses represents the most problematic by-product of the meat industry (Cherya, 1986; Dorfner, 1991) due to the high volumes generated and its very high pollutant load. Regulations restrict the direct sending of blood waste to wastewater treatment plants, so different elimination techniques (drying, incineration, etc.) are usually used to treat this by-product (Rendueles, Moure, Fernández, & Díaz, 1996). Furthermore, proteins constitute one of the main components of blood (Ockerman & Hansen, 1998) and these molecules have economic value, it would seem logical to consider the possibility of recovering these proteins (Wan, Ghost, & Cui, 2002). An alternative solution to this problem is to process blood from slaughterhouses to produce marketable products (Harris, 1989; Walstra, 2003). The food industry could use proteins from blood as additives in dietetic or other products. The functional properties of these proteins are comparable to egg albumin and whey proteins (Crenwelge, Dill, Tybor, & Landmann, 1974).

To carry out the separation and purification of blood proteins, it is necessary to separate the liquid fraction of the blood, plasma, from the cellular fraction. Plasma is basically made up of proteins (7%), water (91%) and a variety of salts and low molecular weight compounds (1%). Most the proteins in blood are found in the plasma, except for hemoglobin, the major protein in the cellular fraction (Gras, 1983). Before plasma can be used or its protein fractions isolated, it is necessary to remove impurities, especially ions and salts. Prior separation of all these compounds from plasma proteins can improve the handling of plasma while also expediting the final separation and purification stage. Removal of the mineral components of plasma is often necessary if it is to be used for human food such as ice creams, cakes and bread (Ghost, 2001).

Several well-known techniques have been developed to remove inorganic compounds from blood plasma (Ghost & Cui, 2000; Khan et al., 2000). Among these techniques, ion exchange and membranes are widely used. However, these treatments can modify the characteristics of the components, producing an undesired effect on the functional properties of the proteins. Denaturation by processing due to pH, ionic strength or filtration can affect the properties of these proteins.

* Corresponding author.

E-mail address: mariodiaz@uniovi.es (M. Díaz).

Functional properties affect the sensory characteristics of food, but they can also influence its physical behavior during preparation, transformation or storage. It is difficult to estimate the functional properties of proteins from their structural characteristics, especially in a protein concentrate such as plasma, which contains different types of proteins (Wismer-Pedersen, 1979). The main properties studied in this work were solubility, foam capacity, emulsifying stability and interfacial tension. The aim was to determine the effect that demineralization processes such as ion exchange (Wang, Wang, Hao, & Lu, 2002) and ultrafiltration can have on such functional properties such as solubility, foam capacity, emulsifying stability and interfacial tension compared with non-processed blood plasma.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The blood of porcine species was obtained from Junquera Bobes slaughterhouse (Noreña, Asturias, Spain). Blood was obtained from five different pigs from the slaughterhouse line, taking 1 L from each and mixing the 5 L collected. Blood was taken as the animal was bled and an anticoagulant, sodium citrate (Panreac) was quickly added at a concentration of 1% (w/v). Subsequently, the blood was centrifuged at 2000g for 30 min to separate the plasma (60% v/v) from the cells (40% v/v) in a Kubota 6700 centrifuge using 250 mL tubes. The plasma thus obtained was kept at 4 °C to avoid bacterial proliferation. Two set of samples with the same number of animals and conditions was carried out 2 weeks and 4 weeks after the first to assess repeatability.

2.2. Methods

Decationed plasma was obtained by passing the standard sample through a borosilicate glass column (Millipore, model Vantage VL32x250) with an internal diameter of 32 mm and a bed height of 120 mm. A peristaltic pump (Masterflex, 7554-60) provided with silicone tubes (model 96400-16) was used to pump the feed. 90 mL of raw plasma was introduced into the column at a feed flow rate of 2 mL/min.

For this experiment, a gel-type Lewatit S-100 strong acid resin (Lanxess Chemical) was used to eliminate cations from the plasma. Its main characteristics are given in Table 1.

To remove the ions from the plasma by ultrafiltration, a Labscale TFF system (Millipore) was used. This modular setup includes a 500 mL acrylic stirrer reservoir and a peristaltic pump. The design of this system allows Millipore's Pellicon XL device to dock directly onto the side of the reservoir. The Pellicon XL device used contained membranes with an effective filtration area of 0.005 m². The average pore size chosen was 10 kDa, as nearly all plasma proteins have a higher molecular weight than this size (Simon, Vandanjon, Levesque, & Bouriseau, 2002).

Table 1
Characteristics of the Lewatit S-100 resin

	S-100
Type	Na cationic
Colour	Amber
Basic matrix	Polystyrene
Active groups	Sulphonic
Granulometry (mm)	0.3–1.25
Apparent density (kg/m ³)	800–900
Humidity (weight %)	42–45
Total capacity (mol /L)	2.2
Useful capacity (mol /L)	1.6
Thermal stability (°C)	–10 to 120

The process followed consisted in feeding 75 mL of standard plasma through the membrane using a feedback circuit. The filtration process was maintained until the flow was about 0.5 mL/min. The membranes were then rinsed using 500 mL of NaOH 0.1 N, fixing a pressure in the pump of 20 psi. Finally, 500 mL of distilled water were pumped through the membrane to complete the washing stage.

2.3. Solubility

The solubility of the plasma was studied in aqueous media. Protein solubility was determined by the De Vouno method (De Vouno, Penteado, Lajolo Franco, & Pereira dos Santos, 1975). This consists of dissolving 0.5 g of protein sample in 10 mL of distilled water. The solution was stirred for 30 min at 2400g in a Kubota Model 6700 centrifuge. pH was varied to test its effect on solubility. Different pH solutions were prepared by adding HCl or NaOH 1 N to obtain the desired pH; the tested pH ranged between 3 and 8. The amount of soluble protein was determined by the Lowry method.

2.4. Emulsifying capacity

Emulsifying capacity measurement is represented by the amount of emulsified oil (hydrophobic polar liquid) per gram of emulsifying oil (hydrophilic polar liquid). In this study, emulsifying capacity was determined using the Inflar and Fortuin method (Inklaar & Fortuin, 1969). Plasma was dissolved in 10 mL of solvent to obtain concentrations ranging between 2 and 10 mg/mL. The solvent used to prepare the protein samples was water with NaCl (0.075%, w/v). The salt increases protein emulsifying capacity because protein folding is induced. Subsequently, 13 mL of cotton oil was added to each sample. After stirring the sample for 15 min, this was centrifuged at 1200g for 10 min. The emulsification percentage was calculated as

$$\%E = \frac{V_c}{V_a} \times 100 \quad (1)$$

where %E is the emulsifying percentage, V_c the volume of emulsified oil (mL) and V_a is the volume of added oil (mL).

2.5. Foam capacity

Foam capacity is the amount of foam formed per unit of solution volume. Mechanical energy is needed to create the air/water interface, while surface agents are needed to maintain it. In these experiments, foam capacity was evaluated using the Baldwin technique (Cheftel, Cuq, & Lorient, 1989). This consists of dissolving 0.17 g of protein in 10 mL of distilled water. A range of pH from 3 to 9 was tested. Foam was obtained by stirring the sample at 400g for 10 min in a Kubota Model 6700 centrifuge. The specific volume of foam was measured in a test tube, foam stability being determined by means of the decrease in foam volume with time, taking samples at 5, 10 and 15 min.

2.6. Interfacial tension

Interfacial tension is a physically measurable macroscopic property of fluids related to the intermolecular forces of attraction between the molecules of a liquid. In order to increase the surface of the liquid, energy is required to overcome these forces of attraction. A Krüss K8 tensiometer was employed in this study. The ring method was chosen as the operational system. This consists of a platinum ring connected to a balance beam which is immersed in a liquid and then slowly withdrawn. The force K necessary to withdraw the ring counter is the interface tension is measured. Using this method, interfacial tension can be expressed as:

$$\sigma = \frac{K}{4\pi r} \quad (2)$$

where σ is the interfacial tension, r is the average value of the outer and inner ring-diameters and K is the force applied.

Different protein concentrations (from 0.4 to 2 mg/ml) were prepared. To carry out the measurement, the ring must be entirely covered with liquid, and repeated lowering of the measuring vessel has to be done until the film “breaks”. The assays were carried out at 20 °C.

All the experimental tests were carried out in triplicate and the average value determined.

3. Results and discussion

3.1. Demineralization of plasma

As outlined, two techniques were used: ion exchange and ultrafiltration. Both techniques were compared in a previous study carried out by our research group (Del Hoyo, Moure, Rendueles, & Díaz, 2007).

Results showed that the ion exchange process can remove 80% of the ions at the breakthrough point (at which the resin begins to be saturated). At this point, the loss of protein was around 14%. Breakthrough curves for sodium and potassium in fixed bed were obtained using the Lewatit S-100 resin. A typical breakthrough curve for sodium is presented in Fig. 1, as an example. All the

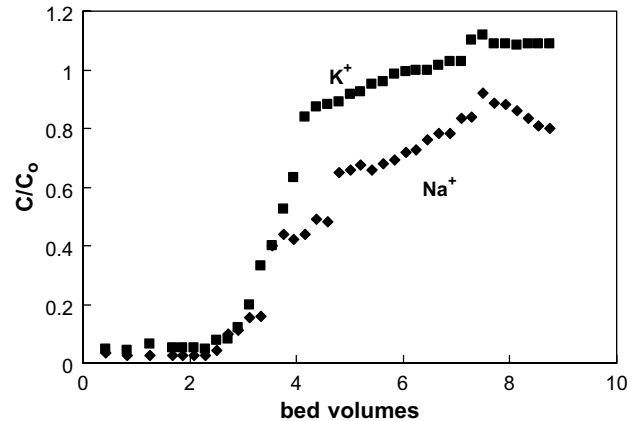


Fig. 1. Breakthrough curve for sodium and potassium using Lewatit S-100 resin.

breakthrough curves obtained had the same shape, showing a compressive front which is of interest.

For the ultrafiltration process, a similar demineralization ratio was found with a VCF (volume concentration factor, i.e. ratio of initial volume of plasma to be filtered and final volume of the retentate) of 4, although the loss of protein was only 1% of total plasma proteins in this case.

Fig. 2 shows the decrease in Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- and SO_4^{2-} concentrations in the retentate versus increasing VCF values. The concentration of ions refers to the initial volume. All the ions behave similarly, with a substantial decrease between VCF = 4 and VCF = 8. Demineralization reaches 80% of total ion concentration using VCF = 4.

Subsequent to treatment of the plasma and the demineralization process, three solutions were used to test functional properties: unprocessed natural plasma; decationed plasma obtained after treatment with the cationic resin; and deionized plasma obtained after passing the plasma through the ultrafiltration membrane. The results are presented below.

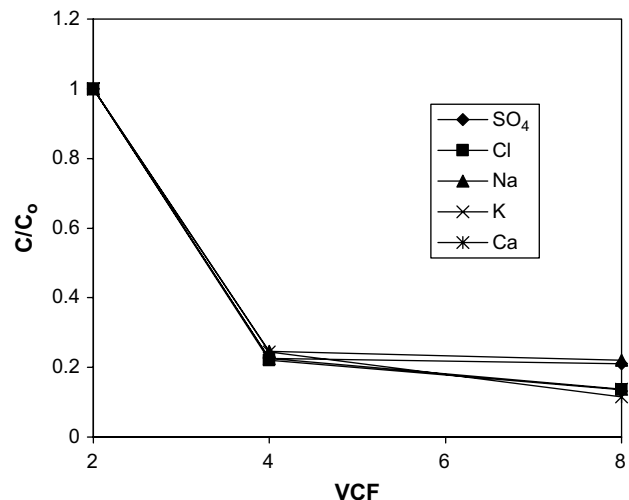


Fig. 2. Concentration of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- and SO_4^{2-} versus VCF.

3.2. Solubility

Solubility results for the three types of plasma are shown in Fig. 3 as a function of pH. It can be seen that the values are higher for the standard and deionized plasma than for the decationed plasma. However, the variations with pH were not significant with a maximum variation around 12% in the pH range tested (3–8) for the standard plasma and around 10% for the other two products.

Standard plasma solubility is between that of the decationed (lower) and deionized plasma (higher), the solubility differences between these last products reaches 25% at pH 6, with a difference around 20% at the other pH's tested. The values for the standard plasma are approximately 10% below those for the deionized plasma and 15% over the values for the decationed plasma. In all cases the statistical variations of the three replicates are about 5%. An increase in protein concentration leads to a decrease in protein–water interaction (Cheftel et al., 1989). Decationed plasma had an average solubility around 57% within the tested pH range. This low value is due to the negative effects that the column treatment has on plasma proteins, since cation removal leads to important charge changes (Diaz, Pereira, & Cobos, 2004; Ragab, Babiker, & Eltinay, 2003). Deionized plasma solubility is around 77% in the same pH range. This demonstrates that UF treatment does not negatively affect solubility because the balance is maintained as both cations and anions are removed, leading to improve water–protein interactions.

For the three samples, minimum solubility was obtained at the isoelectric point of the plasma, around pH 6.4. At this pH, the protein net charges are weak enough to allow the polypeptide chains to clump together, so that their solubility decreases (Tsumura et al., 2005).

The three types of plasma have good solubility and could be added to food products to improve not only their protein content but also their water holding capacity.

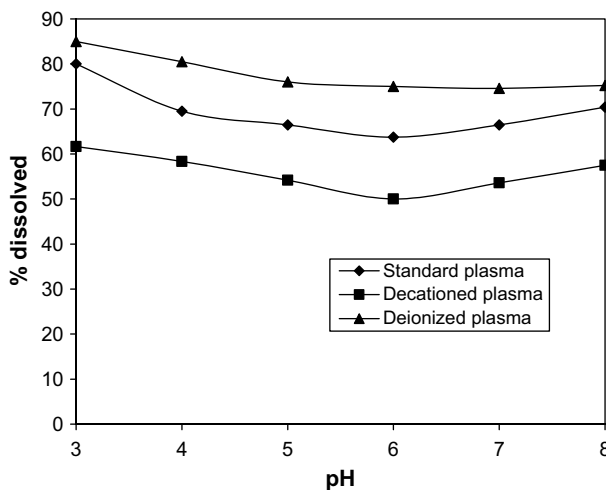


Fig. 3. Effect of pH on solubility of standard, decationed and deionized plasma.

3.3. Emulsifying capacity

The emulsifying capacity of the three types of plasma, at different protein concentrations (from 2 to 10 g/L) are shown in Fig. 4. In these experiments, pH was maintained at 6.5. The variations for the triplicates had a maximum deviation of 3%.

Some proteins have good emulsifying properties at their isoelectric point because of their low solubility. At this point, proteins adopt compact structures that do not permit folding and adsorption at the interface (Rampon et al., 2004). The decationed sample had the best emulsifying capacity at concentrations above 6–7 g/L, reaching

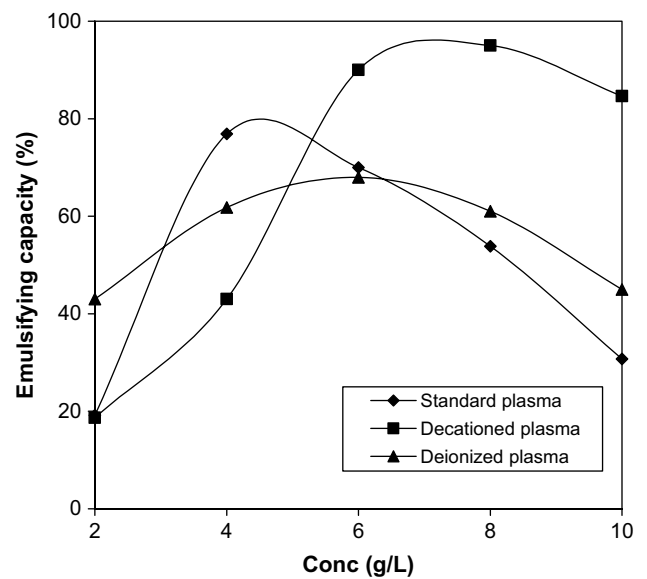


Fig. 4. Emulsifying capacity of standard, decationed and deionized plasma.

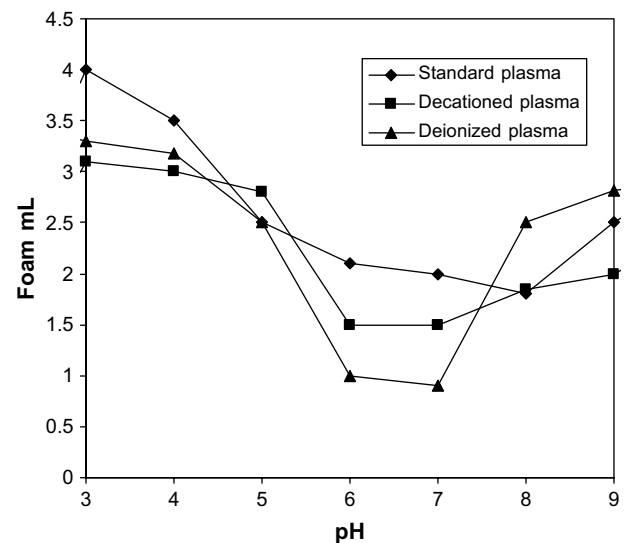


Fig. 5. Effect of pH on foam capacity of standard, decationed and deionized plasma.

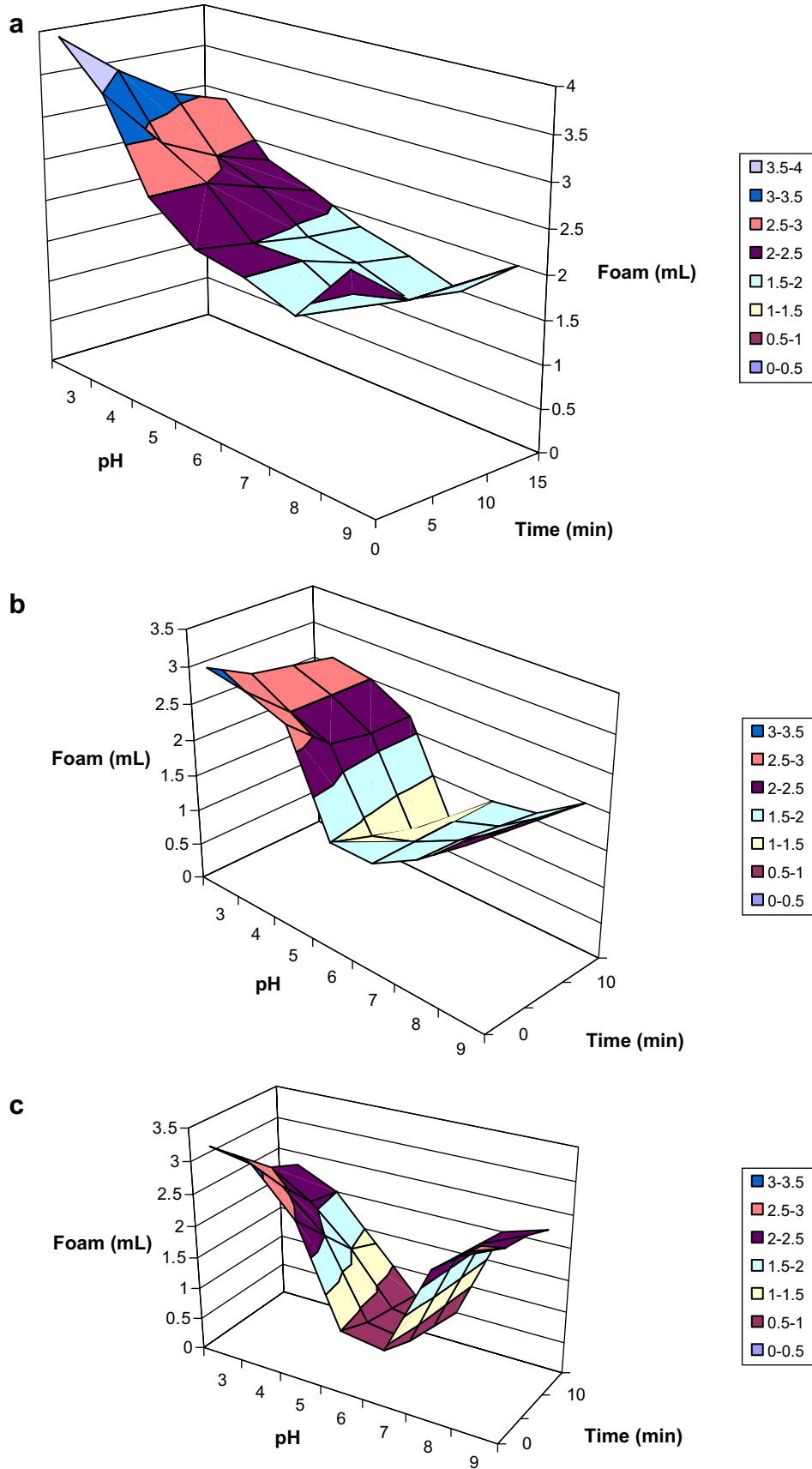


Fig. 6. Effect of pH and foam stability of standard (a), decactioned (b) and deionized plasma (c).

nearly 100% emulsification. The other two samples also had good emulsifying capacities, though with lower values, with maximums of 80% for the standard plasma at a concentration of 4 g/L and 68% for the deionized plasma at a concentration of 6 g/L. This higher emulsifying capacity for the two processed plasmas can be explained by the presence of Na^+ and Ca^{2+} cations causing the proteins to flocculate, thus improving emulsification. As can be seen demineralizing the plasma, far from reducing its emulsification capacity, improves it. This is useful when using plasma as an additive in meat products and preserves.

3.4. Foaming capacity

The volume of foam formed with the three types of plasma is shown in Fig. 5 as a function of pH. Statistical analysis of the triplicates showed differences around 5% at the extreme pH's for the three types of plasma, and around 3% near the isoelectric pH of the plasma proteins.

For all the samples, the highest foaming capacity was observed at extreme pH values. This is due to an increase in viscosity. The lowest foam volumes were close to the isoelectric point of the plasma, this effect was greater for the two processed plasmas. The three plasma samples had their highest foam volumes at pH 3. This could be due to the water molecules being retained by the adsorbed protein in the air/water interface (Lawal, Adebowale, Ogunsanwo, Sosanwo, & Bankole, 2005). However, from pH 4 upwards, the foam volume decreases, until pH 6–7, at which point the volume of foam increases to pH 9. Foam stability was good for the three types of plasma (Fig. 6).

Although decationed plasma produced lower foam volumes than the standard sample, great foaming stability was seen over a wide pH range. After 15 min the maximum loss of foam volume was 22%, lower than that obtained for the deionized plasma (28%) and similar to that of the standard plasma (20%), the statistical deviation was about 5%. This could be due to the removal of Ca^{2+} cations, which improves foam stability (Cheftel et al., 1989). Deionized plasma also had lower foam volumes than the standard plasma although the differences are of the same magnitude as the experimental error of the measurements. This could be explained by the lack of ions, which have an important effect in foam formation and foam stability (Toldra, Elias, Pares, Sagner, & Carretero, 2004).

Comparison of solubility and foaming capacity shows that the lowest values are found at a pH close to the isoelectric point for both properties. As expected, standard plasma has better attributes than the processed plasma, since standard plasma proteins should be less denatured than the proteins of the processed plasma.

3.5. Interfacial tension

The plasmas obtained were dried using a Speed-vac Savant SPD111V setup. Subsequently, different amounts

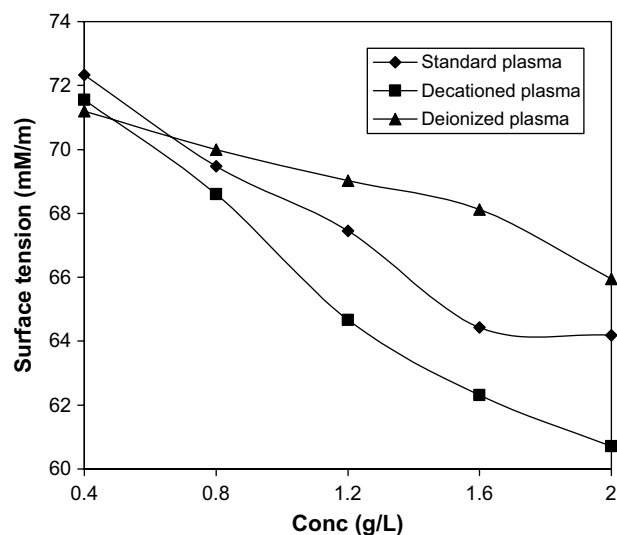


Fig. 7. Interfacial tension of standard, decationed and deionized plasma.

of dried plasma were dissolved in 20 mL of distilled water to obtain a range of protein concentrations, from 0.4 to 2 g/L at constant pH. The results are shown in Fig. 7.

Standard plasma had a interfacial tension around 72 mM/m at a protein concentration of 0.4 g/L. When the protein concentration was increased from 0.4 to 1.6 g/L, a marked decrease in interfacial tension was observed, especially for the decationed plasma. For natural plasma, 63 mM/m was the value at 1.6 g/L. This could correspond to the critical micellar concentration (CMC), which is the protein concentration above which no changes in interfacial tension values are produced (Claesson, Blomberg, & Poptoshev, 2004). CMC is not reached at the studied concentrations in the other two processed samples. Interfacial tension decreases when the protein concentration is increased until reaching the CMC.

A high initial interfacial tension value can be observed for the three samples, which hinders the adsorption of the proteins at the water/oil interface (Wilde, Mackie, Husband, Gunning, & Morris, 2004). Results for standard and deionized plasma show a decrease of around 7 mM/m when the protein concentration increased from 0.4 to 2 g/L. However, decationed plasma undergoes a decrease of 11 mM/m, it being easier to obtain an emulsion with this type of plasma compared with the other two products.

4. Conclusions

The three types of plasma had good emulsifying properties at their isoelectric point, as their proteins adopt compact structures impeding folding and adsorption at the interface. For all the samples, an increase in foam capacity was observed at extreme pH values, due to an increase in viscosity. The lowest foam volume was obtained at the isoelectric point. Major stability over a wide pH range was only observed for the decationed sample. This could be due to the removal of Ca^{2+} cations.

Table 2
Applications of different types of plasma in different foods according functional properties

Sample	Food	Main functional property
Standard plasma	Dairy products, drinks, bread	Solubility, foam capacity
Decationed plasma	Ice-creams, soufflés, bread	Foam capacity
Deionized plasma	Cakes, meat products, dairy products	Solubility, emulsifying capacity

Standard plasma does not have a very high emulsifying capacity in comparison with the two processed plasma, the results though are very close taking into account the experimental deviation was 3%. Standard plasma has good solubility, foam capacity and surface tension. Under different conditions, solubility gives a good indication of possible protein applications, good solubility making them useful in drinks.

Decationed plasma does not have very good solubility or interfacial tension compared to the other two products. However, it has good emulsifying capacity at high protein concentrations, good foam capacity and the best foam stability. Deionized plasma is considered as good protein ingredient as standard plasma. Of the four functional properties, this sample only has poorer foam capacity than the other types of plasma.

The three samples have good functional properties, there being no important differences between the standard and processed plasma. Whereas the column process positively affects emulsifying capacity and foam capacity, the UF process has a useful influence on solubility, emulsifying capacity and interfacial tension. Both treatments improve emulsifying capacity. Some uses have been suggested in Table 2, although many other uses could be developed taking into account the good functional properties of plasma proteins.

References

- Cheftel, J. C., Cuq, J. L., Lorient, D. (1989). *Proteínas alimentarias (Food Proteins)*. Zaragoza, (Spain), Ed Acribia.
- Cherya, M. (1986). *Ultrafiltration handbook*. Pennsylvania: Technomic Pub. Co. Inc..
- Claesson, P. M., Blomberg, E., & Poptoshev, E. (2004). Surface forces and emulsion stability. In S. Friberg, K. Larsson, & J. Sjöblom (Eds.), *Food emulsions (cap. 7)*. New York: Marcel Dekker.
- Crenwelge, D. D., Dill, C. W., Tybor, P. T., & Landmann, W. A. (1974). A comparison of emulsification capacities of some protein concentrates. *Journal of Food Science*, 39(910), 175–177.
- De Vouno, M., Penteado, C., Lajolo Franco, M., & Pereira dos Santos, N. (1975). Functional and nutritional properties of isolated bovine blood proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30, 809–815.
- Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. *Meat Science*, 76, 402–410.
- Díaz, O., Pereira, C. D., & Cobos, A. (2004). Functional properties of ovine whey protein concentrates produced by membrane technology after clarification of cheese manufacture by-products. *Food Hydrocolloids*, 18, 601–610.
- Dorfner (1991). *Ion Exchangers*. New York: Walter de Gruyter.
- Ghost, R. (2001). Fractionating of biological macromolecules using carrier phase ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 74, 1–11.
- Ghost, R., & Cui, Z. F. (2000). Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. *Journal of Membrane Science*, 167, 47–53.
- Gras, J. (1983). *Plasma proteins*. Barcelona, Spain: Lims.
- Harris, E. R. V. (1989). *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University.
- Inklaar, P. A., & Fortuin, J. (1969). Determining the emulsifying and emulsion-stabilizing capacity of protein meat additives. *Food Technology*, 23, 103–107.
- Khan, D. W., Bultter, M. D., Cohen, D. L., Gordon, M., Khan, J. W., & Winkler, M. E. (2000). Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration. *Biotechnology and Bioengineering*, 69, 101–106.
- Lawal, O. S., Adebawale, K. O., Ogunsanwo, B. M., Sosanwo, O. A., & Bankole, S. A. (2005). On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flours of African locust bean (*Parkia biglobosa*). *Food Chemistry*, 92, 681–691.
- Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. (1998). *Animal by-product processing and utilization*. Florida, USA: CRC Press.
- Ragab, D. M., Babiker, E. E., & Eltinay, A. H. (2003). Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration. *Food Chemistry*, 84, 207–212.
- Rampon, V., Brossard, C., Mouhous-Riou, N., Bousseau, B., Llamas, G., & Genot, C. (2004). The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin. A front-surface fluorescence study. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–09, 87–94.
- Rendueles, M., Moure, F., Fernández, A., & Díaz, M. (1996). Preliminary studies on the processing of slaughterhouses blood for protein recovery. *Resource and Environmental Biotechnology*, 1, 193–206.
- Simon, A., Vandanjon, L., Levesque, G., & Bourseau, P. (2002). Concentration and desalination of fish gelatin by ultrafiltration and continuous diafiltration processes. *Desalination*, 144, 313–318.
- Toldra, M., Elias, A., Pares, D., Saguero, E., & Carretero, C. (2004). Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 88, 461–468.
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., & Inouye, K. (2005). Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis LWT. *Food Science Technology*, 38, 255–261.
- Walstra, P. (2003). *Physical chemistry of foods*. New York: Marcel Dekker Inc..
- Wan, Y., Ghost, R., & Cui, Z. (2002). High resolution plasma protein fractionation using ultrafiltration. *Desalination*, 144, 301–306.
- Wang, J., Wang, S., Hao, J., & Lu, G. (2002). The desalting property of ion-exchange resins in organic solvent. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 10, 567–569.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., & Morris, V. (2004). Proteins and emulsifiers at liquid interfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–09, 63–71.
- Wismer-Pedersen, J. (1979). Use of haemoglobin in foods utilization of animal blood in meat products. *Food Technology*, 33, 76–80.

Desnaturalización y renaturalización de proteínas procedentes de residuos alimenticios

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz *

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, Facultad de Química, C/Julián Clavería s/n, 33071 Oviedo, España

*Autor correspondiente. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.
Dirección de correo electrónico: mariodiaz@uniovi.es (M. Díaz)

Resumen

Las proteínas son biomoléculas con un alto valor biológico que pueden ser añadidas a numerosos productos alimenticios, ya que constituyen un excelente componente nutricional y, gracias a sus propiedades funcionales, pueden ser empleadas como espesantes, gelificantes, espumantes o colorantes. Existen varios subproductos de la industria alimentaria susceptibles de ser aprovechados por su elevado contenido proteico. Sin embargo, para llevar a cabo el aislamiento de estas macromoléculas se hace necesario el procesamiento de los subproductos que las contienen lo que provoca, en mayor o menor medida, su desnaturalización. En este trabajo se analizó la posibilidad de recuperar la conformación nativa (renaturalización) de proteínas alimentarias previamente desnaturalizadas. Para ello se emplearon muestras de lisozima, una proteína con actividad enzimática, que ha permitido emplear el método de Jolles. Los resultados muestran valores en torno al 40% de recuperación de la capacidad natural de la enzima ensayada y se ha observado la importancia que la agitación tiene en el proceso.

Palabras clave: subproductos, proteínas, desnaturalización, renaturalización.

1. Introducción

Existen diversos residuos alimentarios que presentan un alto contenido proteico. Tal es el caso de la clara de huevo procedente de las industrias de derivados del huevo, la sangre de diferentes especies animales procedente de los mataderos o el suero lácteo proveniente de las industrias lácteas y queseras. Las proteínas son macromoléculas que tienen un elevado valor biológico y que cumplen multitud de funciones, por ello los productos con un alto contenido en proteínas pueden emplearse como ingredientes en diversos productos alimentarios incrementando su valor nutritivo o actuando como gelificantes, espesantes, espumantes, colorantes, etc. (Del Hoyo y cols., 2007; Ockerman y Hansen, 1998; Rendueles y cols., 1996). Por ejemplo, la sangre procedente de los mataderos y sus fracciones se adicionan a una amplia gama de alimentos con

finos diversos: mejoran la textura y jugosidad de los embutidos, en la fabricación de pan se consigue un volumen de hinchado significativamente superior e incluso se puede extrusionar para elaborar un producto similar a la carne bastante aceptable.

El aislamiento de estas biomoléculas pasa por el procesamiento de los residuos alimentarios que las contienen lo que provoca, en mayor o menor grado, un proceso de desnaturalización. El grado de desnaturalización de las proteínas puede medirse por su constante de sedimentación en una ultracentrífuga, viscosidad, emigración en un campo eléctrico (electroforesis), dispersión óptica rotatoria, propiedades termodinámicas (calorimetría diferencial), propiedades biológicas e inmunológicas, reactividad de algunos grupos funcionales o por dicroísmo circular (Privalov y cols., 1989; Anson y Mirsky, 1932). La conformación de una proteína basada en sus estructuras secundaria y terciaria es frágil. Por ello, el tratamiento de las proteínas por los ácidos, bases, soluciones salinas concentradas, disolventes, calor, radiaciones, etc., puede modificar de una forma más o menos importante estas estructuras.

La desnaturalización proteica puede definirse como cualquier modificación de su conformación (a nivel de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria) que no vaya acompañada de la ruptura de los enlaces peptídicos implicados en la estructura primaria (Cantor y cols., 1980). La desnaturalización es un fenómeno complejo durante el cual aparecen conformaciones nuevas, frecuentemente fugaces y efímeras (Lehninger, 1978). El estado final de la desnaturalización puede corresponder a una estructura polipeptídica, totalmente desplegada (unfolded), en la que son transitorias las interacciones intraproteicas y proteínas disolventes. Sin embargo, un aumento del nivel de estructura, por encima del nivel de la estructura natural, también debe considerarse como una forma de desnaturalización. Algunas proteínas ya están en su forma natural desplegadas (monómeros de algunas caseínas) lo que explica su estabilidad frente a determinados agentes desnaturalizantes, como por ejemplo el calor.

Los efectos de la desnaturalización son numerosos y entre ellos conviene citar el descenso de la solubilidad resultado del desbloqueo de grupos hidrófobos, la alteración de la capacidad de fijación de agua, la pérdida de actividad biológica (por ejemplo enzimática o/y inmunológica), el aumento de la sensibilidad al ataque de las proteasas (debido al desbloqueo de enlaces peptídicos correspondientes a los sitios de acción específica de las proteasas), el aumento de la viscosidad intrínseca, o incluso, su incapacidad a la cristalización. La sensibilidad de una proteína a la desnaturalización está en función de la velocidad con la cual el agente desnaturalizante rompe las interacciones o enlaces que establecen las estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias.

Como estas estructuras varían de una proteína a otra, los efectos de los agentes desnaturizantes van a depender de la proteína.

La desnaturalización puede ser reversible o irreversible pero cuando se rompen los enlaces disulfuro que contribuyen a la conformación de las proteínas la desnaturalización es, normalmente, irreversible (Mahler y cols., 1971). El proceso mediante el cual la proteína desnaturizada recupera su estructura nativa se llama renaturalización (refolding). En la Figura 1 se muestra un esquema del proceso de renaturalización (refolding) en el que se parte de proteínas desnaturizadas que presentan una conformación desplegada. El efecto de un agente renaturalizante puede hacer que recuperen su estructura plegada hasta alcanzar la conformación nativa. Para que tenga lugar la renaturalización deben cumplirse dos requisitos: la concentración salina debe ser alta ($[\text{NaCl}]$ entre 0,15 y 0,5 M) para eliminar la repulsión entre los grupos fosfato de las dos cadenas, y la temperatura deber ser lo suficientemente elevada como para romper los puentes de hidrógeno intracatenarios producidos al azar en el DNA monocatenario, y lo suficientemente baja como para estabilizar los apareamientos correctos entre las bases de cadenas distintas.

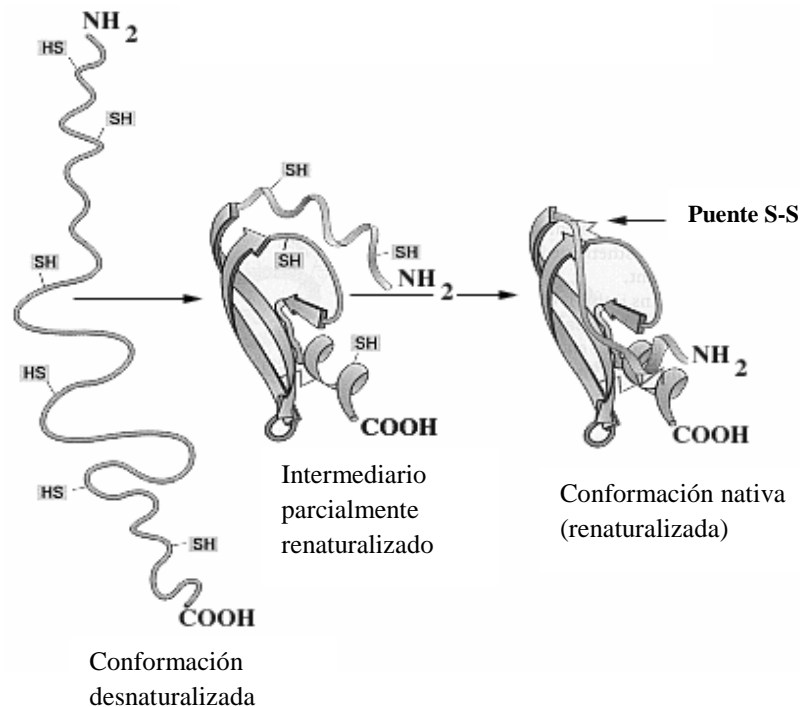


Fig. 1. Esquema del proceso de renaturalización (refolding). (4)

Para evaluar el grado de renaturalización de proteínas que han sufrido un proceso de desnaturalización deben emplearse proteínas que presenten actividad enzimática. Por ello, en este caso se ha empleado lisozima, ya que esta de esta manera es posible utilizar el método de Jolles (Jolles, 1962) de análisis de la actividad enzimática.

El objetivo de este trabajo es evaluar la posibilidad de recuperar la conformación nativa de proteínas con actividad enzimática que han sido previamente desnaturalizadas. Para ello se utilizará una técnica de renaturalización (refolding) por dilución.

2. Materiales y métodos

2.1. Desnaturalización

La lisozima de clara de huevo (Sigma) fue sometida a un proceso de desnaturalización similar al sufrido durante el procesado industrial. Para ello se disolvió en un tampón de desnaturalización constituido por una disolución 0.05 mol/l Tris – HCl a pH 8.7, conteniendo 8 mol/L de urea y 0.1 mol/L de ditioneitol (DTT, Sigma). Todo ello fue realizado en vasos de precipitados preparándose volúmenes de 50 mL. Tras la incubación durante 4-5 horas a temperatura ambiente, se analizó la actividad enzimática para confirmar si la proteína había sido desnaturalizada completamente (Li y cols., 2002).

2.2. Renaturalización de una proteína alimentaria con actividad enzimática (lisozima)

Para evaluar la renaturalización de proteínas que han sufrido un proceso de desnaturalización se ha utilizado la lisozima, ya que es una proteína con actividad enzimática. La lisozima desnaturalizada fue disuelta en un tampón de renaturalización controlando que la concentración de la proteína fuese baja para evitar la formación de agregados. El tampón de refolding está constituido por 0.1 mol/L Tris – HCl a pH 8.7, conteniendo 2 mol/L de urea, 3 mmol/L de glutatona reducida (GSH, Sigma), 0.3 mmol/L GSSG y 0.15 mol/L NaCl. De nuevo, todo fue realizado en vasos de precipitados preparándose volúmenes de 50 mL.

El análisis de la actividad enzimática fue determinado por el método de Jolles (Jolles, 1962). Para ello, la absorbancia a 450 nm de *Micrococcus lysodeikticus* (BCCM/LMG Bacteria collection) suspendidos en 0.06 mol/L de fosfato potásico (pH 6.2) se ajustó a 0.7. El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de los microorganismos fue Nutrient Broth (Panreac). Tras la adición de 10-20µL de la solución de lisozima desnaturalizada, se midió el descenso en la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-vis Modelo 1023.

En la Figura 2 se muestra el diagrama del proceso de desnaturalización y posterior renaturalización de la lisozima. A_0 hace referencia a la absorbancia producida únicamente por el tampón (fosfato potásico), A_1 a la absorbancia generada por el tampón y los microorganismos, A_3 a la absorbancia producida al añadir al tampón con los microorganismos la enzima (lisozima) sin tratar, A_2 a la absorbancia al añadir al tampón con los microorganismos la enzima desnaturalizada y A_4 a la absorbancia al añadir al tampón con los microorganismos la enzima renaturalizada.

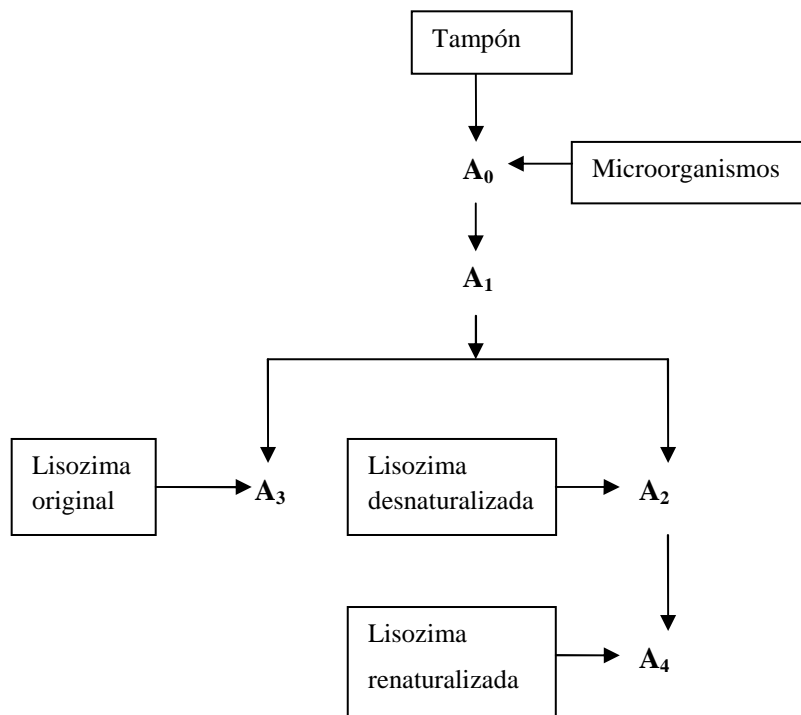


Fig. 2. Diagrama del proceso de renaturalización de lisozima.

En la figura 3 se muestra el esquema teórico del proceso de renaturalización. La etapa $A_0 \rightarrow A_1$ hace referencia a la absorbancia producida por los microorganismos, la $A_1 \rightarrow A_2$ corresponde a la desnaturalización, la $A_1 \rightarrow A_3$ a la capacidad enzimática de la lisozima natural y, por último, la $A_2 \rightarrow A_4$ representa la capacidad de la enzima renaturalizada.

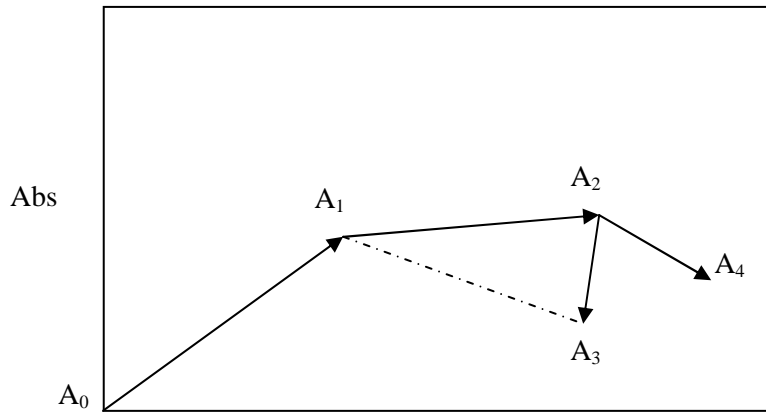


Fig. 3. Esquema del proceso de renaturalización.

Al añadir la lisozima natural (A_3) se produce un descenso en la absorbancia debido a su efecto lítico sobre los microorganismos. Por tanto, la adición de la lisozima desnaturalizada (A_2), que ya ha perdido su función, hace que el valor de la absorbancia vuelva a ser tan alto o incluso más, que antes de añadir la lisozima. Por último, al añadir la lisozima renaturalizada (A_4) se vuelve a conseguir un descenso de la absorbancia, ya que la proteína ha recuperado su actividad lítica.

3. Resultados y discusión

3.1. Curva de calibrado de *Micrococcus lysodeikticus*

Estudios teóricos y experimentales han mostrado que soluciones diluidas de diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración de peso seco. Esto quiere decir que, en disoluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco, independientemente del tamaño celular del microorganismo. Sin embargo, se encuentran absorbancias muy diferentes por partícula o por UFC (Unidad Formadora de Colonia) cuando los tamaños de las células bacterianas son diferentes. Por esta razón, para estimar el número de microorganismos totales o el número de microorganismos viables de una suspensión bacteriana debe realizarse una "curva de calibración" con cada tipo de microorganismo, sólo de esta forma es posible relacionar Absorbancia (Densidad Óptica) con el número de microorganismos totales o con UFC.

En la Figura 4 se muestra la curva de calibrado de *Micrococcus lysodeikticus*. Para poder ajustar la absorbancia a 0,7 tal como indica el método de Jolles, se disolvieron diferentes

concentraciones de microorganismos en 10 mL de tampón fosfato-potásico. Se puede comprobar que existe una buena linealidad de la recta patrón para el rango de concentraciones estudiado.

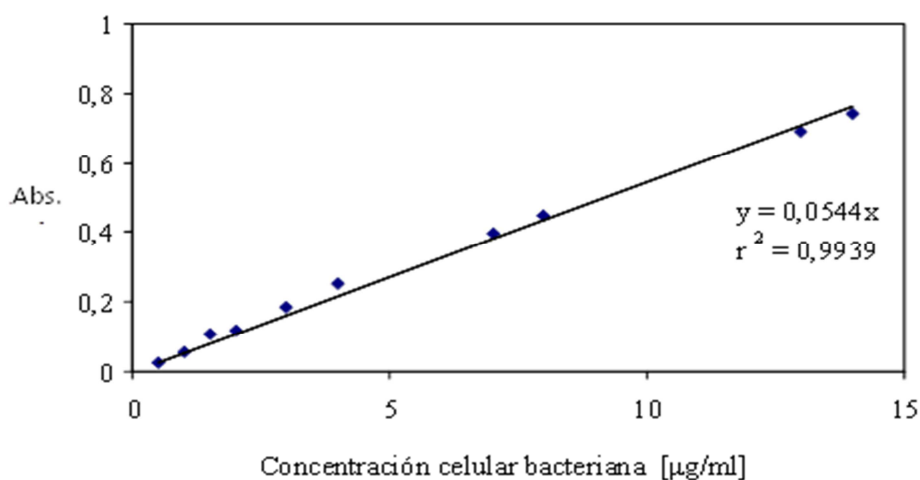


Fig. 4. Curva de calibrado de *Micrococcus lysodeikticus*.

3.2. Renaturalización

Se realizaron distintos ensayos en los que las muestras utilizadas presentaban una concentración de lisozima de 0.02 mg/mL de tampón. A todas ellas se les adicionó la misma cantidad de microorganismos (50 mg/mL), midiéndose la absorbancia a 450 nm. A continuación, se llevó a cabo la dilución de la solución de lisozima desnaturalizada en el tampón de refolding controlando que la concentración de la proteína fuese baja para evitar la formación de agregados.

La Figura 5 muestra los resultados de dos ensayos realizados agitando constantemente las muestras. Pese a que se añadió la misma cantidad de microorganismos (A_0) en ambos casos la absorbancia obtenida fue muy dispar. Esto es debido a que las pruebas se realizaron en momentos diferentes de la curva de crecimiento de los microorganismos y, por tanto, la cantidad de microorganismos que hay en el medio de cultivo, según la fase de crecimiento en la que se encuentren, es diferente.

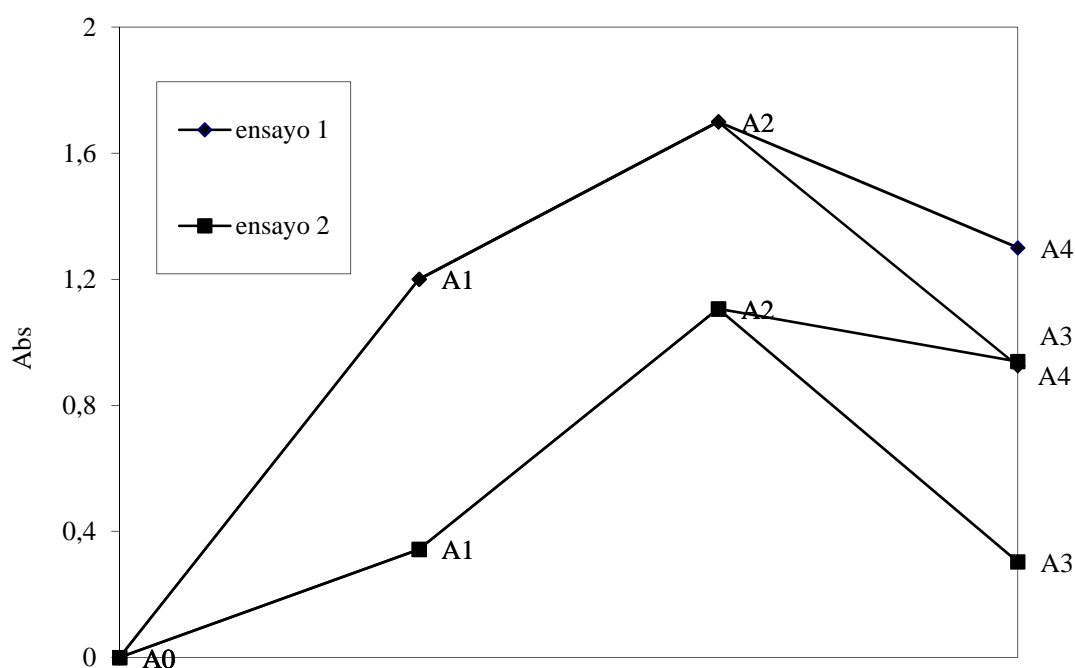


Fig. 5. Renaturalización de lisozima por dilución.

La diferencia entre A_2 y A_3 da idea de la eficacia de la enzima natural. Así mismo, la diferencia entre A_2 y A_4 corresponde a la capacidad enzimática de la enzima renaturalizada. Se puede considerar de forma inicial la eficacia (η) como:

$$\eta = \frac{A_2 - A_3}{A_2 - A_4} * 100 \quad (10)$$

que da una idea previa de la eficacia de la renaturalización respecto a la actividad enzimática. Como era de esperar, los valores de A_3 son más bajos que los de A_4 , de manera que la eficacia de la renaturalización siempre resulta un valor inferior a la unidad. Para el primer ensayo, la eficacia de renaturalización fue aproximadamente del 50%, mientras que para el segundo fue del 44%.

La Figura 6 muestra la eficacia de la agitación en el proceso de refolding. Para los ensayos realizados sin agitación la eficacia de la renaturalización es prácticamente imperceptible, poniendo de manifiesto que la falta de agitación influye negativamente en los procesos tanto de desnaturalización como de refolding.

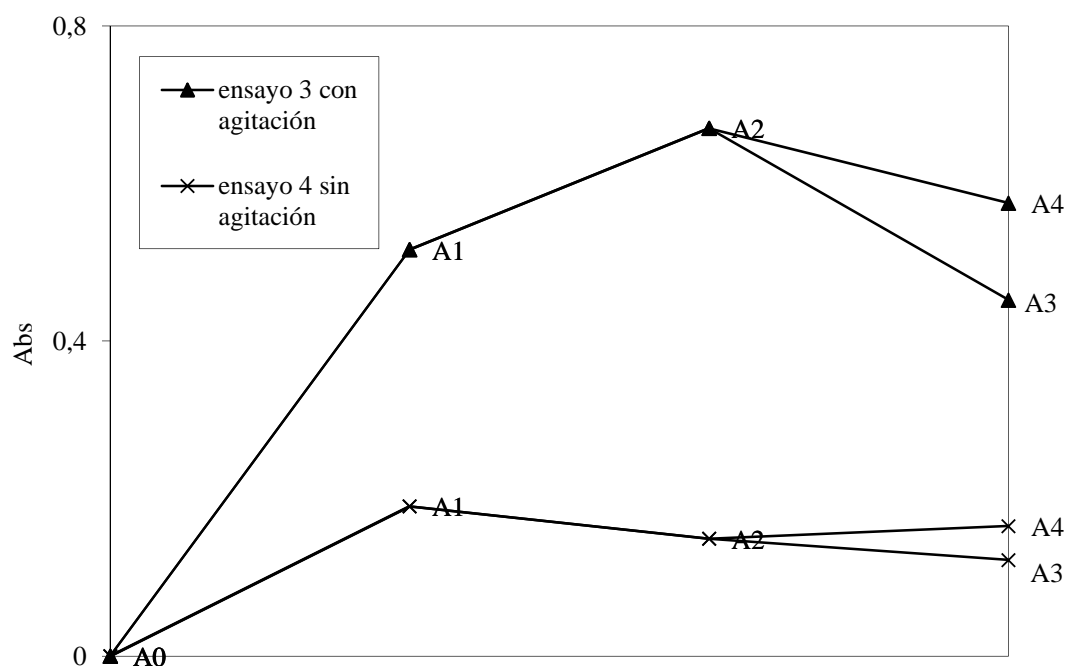


Fig. 6. Comparativa de los procesos de refolding llevados a cabo con y sin agitación.

La Figura 7 muestra la evolución del proceso de renaturalización. Se puede observar cómo se produce un incremento de la actividad lítica con el tiempo, muy acusado en el caso de las pruebas 1 y 2, moderado en la 3 e inexistente en la 4 debido a la falta de agitación. Para todas las muestras se observa cómo, a las 24 horas, apenas se produce modificación.

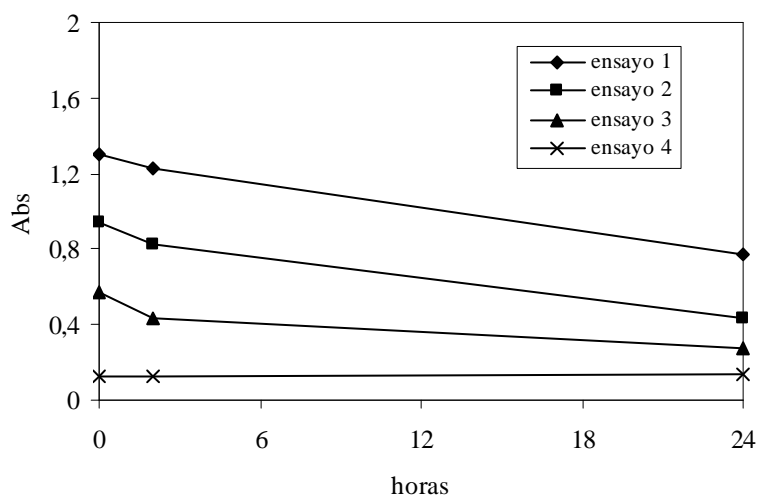


Fig. 7. Evolución del proceso de renaturalización con el tiempo.

4. Conclusiones

Diferentes subproductos de la industria alimentaria presentan un alto contenido proteico. En este estudio se ha analizado la desnaturalización que las proteínas alimentarias sufren al ser procesadas. Asimismo, también se ha ensayado la posibilidad de recuperar la conformación nativa (renaturalización) de estas proteínas previamente desnaturalizadas. El método de Jolles de análisis de la actividad enzimática se basa en el empleo de *Micrococcus lysodeikticus* y ha requerido del uso de una proteína con actividad enzimática como es la lisozima. Esta proteína alimentaria, que en estado nativo presenta un efecto lítico sobre los microorganismos, al ser desnaturalizada deja de ejercer su función. Sin embargo al ser renaturalizada recupera en parte esa capacidad. Los resultados de este estudio muestran valores, en algunos casos, del 50% de recuperación de la capacidad natural de la enzima ensayada. Sin embargo, esta eficacia es mucho menor en el caso de muestras que no han sido agitadas durante el proceso.

5. Referencias

1. Anson, M.L. and Mirsky A.E. "The effect of denaturation on the viscosity of protein systems", The Rockefeller Institute for Medical Research, (1932), 15 (3), 341-350.
2. Cantor, C.R. Schimmel, P.R., "Biophysical Chemistry. Part 1: The conformation of biological macromolecules. Part 2: The behaviour of macromolecules". W.H., Freeman and Co, San Francisco, (1980).
3. Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M., and Díaz, M. " Desmineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration". Meat Science, 76 (2007), 402-410.
4. http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/CultbBact/Reque.htm. (consultado abril 2010).
5. Jolles P., "Lysozymes from rabbit spleen and dog spleen". Methods Enzymol., (1962), 5, 137-140.
6. Lehninger, A.L., "Bioquímica". Ed. Omega, (1978), 121-141.
7. Li M., Zhang G., Su Z., "Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield lisozyme". J. Chromatogr. A, (2002), Volume 959, Number 1, 113-120.
8. Mahler, H.R., E.H. Cordes, "Biological Chemistry", 2nd ed., Harper and Row Pub., New York, (1971).
9. Ockerman, H.W., Hansen, C.L., "Animal By-Product Processing and Utilization", CRC Press, Florida (USA), (2000).

10. Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov S.Yu, Griko, YuV., Makhatadze1, G.I., Khechinashvili, N.N. "Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state". Journal of Molecular Biology, (1989), 737-750.
11. Rendueles, M., Moure, F., Fernández, A., Díaz, M., "Preliminary studies on the processing of slaughter-house blood for protein recovery", Resource Environ. Biotechnol., (1996), 1, 193-206.

CAPÍTULO 5:
SÍNTESIS DE MATERIALES A PARTIR DE LAS
PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN CELULAR

Aprovechando la capacidad gelificante de las proteínas sanguíneas se han elaborado geles con multitud de usos potenciales. En este capítulo se analizan los geles desarrollados a partir de la fracción celular de la sangre a través de un tratamiento térmico inducido. En concreto se incluye un artículo en el que se evalúan geles sintetizados con hemoglobina y otro en el que se analizan los elaborados con globina decolorada.

En sendos artículos se realiza una caracterización reológica de los nuevos productos y se lleva a cabo un estudio de sus propiedades térmicas, análisis de la distribución granulométrica de sus partículas, microestructura y capacidad de retención de agua. Así mismo, en algunos casos se evalúa si el proceso de liofización afecta al comportamiento reológico de las muestras.

Rheological characterization of heat induced gels of porcine haemoglobin

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz*

*Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Oviedo, Faculty of Chemistry,
C/ Julián Clavería s/n, 33071 Oviedo, Spain.*

*Corresponding author. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.

E-mail address: mariodiaz@uniovi.es(M. Díaz)

Abstract

Porcine haemoglobin (Hb) is a by-product of the meat industry that could be employed as a film to protect food products due to its good gelling properties. Despite its importance from a technical point of view, rheological studies of porcine Hb gels have barely been carried out. In this study, Hb films prepared under different conditions (at pH 2, 7 and 10) were analyzed using rheological measurements in combination with differential scanning calorimetry, particle size measurement and scanning electron microscopy (SEM). Furthermore, lyophilization was evaluated as a possible technique to increase product shelf life. Results showed that both fresh and lyophilized gels were more elastic than viscous gels. G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) values increased with increasing pH, though an important decrease in both moduli was observed with increasing temperatures. For most of the pH studied, Hb gels behaved pseudoplastics (shear thinning) and both fresh and Hb gels made of lyophilized solutions prepared at pH 7 exhibited the greatest resistance to deformation. Particle size measurements showed that gels synthesized at extreme pH were more polydisperse than those synthesized at pH 7, while SEM images revealed important differences in microstructure depending on pH.

Key words: gel, porcine haemoglobin, rheological characterization.

1. Introduction

Animal blood is a by-product of the meat industry that can be used as a foodstuff owing to its high protein content (Ockerman & Hansen, 1998; Rendueles et al., 1996). Proteins are largely used in the food industry for their good functional and physical properties, which include gelling, emulsifying and foaming abilities (Parés & Ledward, 2001; Silva & Silvestre, 2003). To carry out the separation of blood proteins, it is necessary to separate the liquid fraction of the blood, plasma (Harris, 1989), from the cellular fraction. Numerous studies have been published on the functional and physical properties of plasma proteins (Howell & Lawrie, 1984; Parés et al., 1998; Del Hoyo et al., 2007). Nevertheless, despite their high potential

economic value, proteins from the cellular fraction have barely been recovered (Salvador et al., 2008). The main protein in the cellular fraction is haemoglobin (Hb), a globular protein with a molecular weight of 67 kDa composed of four haem groups and four protein subunits.

Porcine Hb presents excellent functional properties (Toldrá et al., 2004) and so could be used as a material to protect food thanks to its good gelling ability. There are some reports on the development of porcine blood protein gels (Salvador et al., 2008; Dávila et al., 2006). Hb gels were prepared in the present study. The ability to gel is one of the most widely studied features of proteins owing to its importance in the area of science and food technology. This property plays a key role in the preparation of many foodstuffs and could even be used to develop new materials for covering foods. Gelation occurs when denatured molecules aggregate to form an organized protein network and it is widely known that heat treatment is essential to achieve gelation in the majority of cases. The properties of gels are influenced by many factors, such as pH, protein concentration or pre-treatments of proteins (Silva & Silvestre, 2003). It has been proven that the presence of salts improves gelling capacity (Oshodi & Ojokan, 1997); hence the porcine blood used in this study was not demineralized. A heat treatment was necessary to prepare these gels and different pH were chosen to simulate the acidity of foodstuffs such as lemons, plums or some jams (which present a pH of around 2), the neutrality of pork, chicken or fresh fish (pH of around 7) or the basicity of white eggs (pH of around 10). It should also be noted that lyophilization was evaluated as a possible technique to increase the shelf life of the films as protective agents.

Understanding rheology is critical for optimizing product development efforts, the processing methodology and the final product quality (Steffe, 1996) due to the fact that rheological stability is considered an important quality parameter (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas, 2005). To date, rheological measurements of porcine Hb gels have barely been carried out. Rheological results can be compared with those obtained from differential scanning calorimetry, which is a thermoanalytical technique in which the difference in the amount of heat required to increase the temperature of a Hb gel and a reference is measured as a function of temperature. In addition, particle size measurements and SEM images are techniques that can allow us to improve our knowledge of the microstructure of Hb gels.

The aim of this paper was to produce and characterize Hb gels from porcine blood that could be used as films to protect food products. To achieve this purpose, rheological tests were developed, such as temperature sweeps, stress sweeps, flow curves and creep and recovery

tests. Furthermore, differential scanning calorimetry, particle size measurement and scanning electron microscopy (SEM) were also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Blood

The blood from porcine species used in this study was obtained from the Junquera Bobes slaughterhouse (Noreña, Asturias, Spain). As the animal was bled, blood was taken and an anticoagulant such as sodium citrate (Panreac) was quickly added in a concentration of 1% w/v. The blood was subsequently centrifuged at 10000xg for 10 minutes in order to separate the plasma (60% in volume) from the cells (40%) in a Kubota 6700 centrifuge using 250 mL tubes. The cellular fraction thus obtained was kept at 4 °C to avoid bacterial proliferation.

2.2. Haemoglobin

Hb was removed by the break-up of erythrocytes through osmotic shock. Removal of plasmatic membranes was subsequently carried out using an organic solvent (chloroform) in a proportion of 4:1 (chloroform/solution). Chloroform is able to drag plasmatic membranes and hence separate them from the Hb. The mixture was then centrifuged at 10000 xg for 10 minutes, thus obtaining a supernatant consisting of an aqueous solution of Hb and a precipitate formed by chloroform emulsified with the plasmatic membranes. Finally, a portion of fresh Hb was freeze-dried at - 70 °C and 0.1 mbar in a Telstar Cryodos Lyophilizator. Samples were frozen at - 80°C prior to lyophilization. The dry extract of lyophilized samples was approximately 96 % (w/w).

2.3. Preparation of haemoglobin gels

Fresh and lyophilized Hb solutions were dissolved in distilled water to obtain a protein concentration of 17% (w/w) (Salvador et al., 2008) and the pH solutions were adjusted to 2, 7 or 10 with 0.5M HCl or 0.5M NaOH. Hb solutions were placed on 80 mm diameter glass plates (TDS Pierron), adding approximately 3 g of solution, and were then heated in an incubator (J.P. Selecta 2000209) at 85±1 °C for 45 min. After heat-induced gelation, samples were immediately cooled to 20±1 °C for 15 min and stored at 4±1 °C for 24 hours before being analyzed.

2.4. Rheological determinations

Rheological tests were carried out on a Haake MARS II rotational rheometer equipped with a Peltier unit to control the temperature. To avoid slippage, a serrated plate/plate measuring system (PP35) was used, with a gap of 1 mm. All tests (except the temperature tests and flow curves) were carried out at 20 ± 0.1 °C. Before starting any measurement, samples rested for at least 15 min, allowing the stresses induced during sample loading to relax (Laca, Sáenz, Paredes & Díaz, 2009). A glass hood and silicone oil were employed to avoid sample desiccation during the analyses. Samples were analyzed in triplicate.

Steady state flow curves were obtained in Controlled Stress (CS) mode at 6 ± 1 ° C from 0 to 50 Pa of shear stress. These tests allowed us to classify the different types of fluids. A general relationship to describe the behaviour of non-Newtonian fluids could be the Herschel Bulkley model (Steffe, 1996):

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad \text{Herschel-Bulkley Law (1)}$$

where τ is the shear stress (Pa), τ_0 the yield point (Pa), $\dot{\gamma}$ the shear rate (s^{-1}), k the consistency coefficient ($Pa \cdot s^n$) and n is the flow behaviour index (dimensionless). This equation is very convenient because Newtonian fluids, shear-thinning fluids (when $0 < n < 1$), shear-thickening fluids (when $1 < n < \infty$) and Bingham plastic fluids may be considered special cases of the Herschel-Bulkley model (as can be seen in Table 1).

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996)

Fluid	k	n	τ_0
Herschel-Bulkley	>0	$0 < n < \infty$	>0
Newtonian	>0	1	0
Shear-thinning (pseudoplastic)	>0	$0 < n < 1$	0
Shear-thickening (dilatant)	>0	$1 < n < \infty$	0
Bingham plastic	>0	1	>0

Creep and recovery tests were conducted under transient conditions to gain an understanding of the internal structure of the gel. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at 20 ± 1 ° C. The recovery tests, also at 20 ± 1 ° C, lasted 180 seconds. One of the most widely used models that reflects the deformation of a system is the

four-parameter Burger model, which represents the association of purely elastic or purely viscous behaviour in series (Maxwell model) or in parallel (Kelvin-Voigt model). In the Burger model, the system deformation, called compliance (J), corresponds to the following equation (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (2)$$

where J_0 is the instantaneous compliance, J_1 the retarded compliance, λ_{ret} the retardation time (time to achieve maximum strain) and μ_0 is the Newtonian viscosity of the free dashpot. The sum of J_0 and J_1 is called the steady state compliance (J_{ss} and λ_{ret} represents the ratio $\frac{\mu_0}{G_0}$, where G_0 is the instantaneous elastic modulus of the Maxwell unit.

Obtaining the values of J_{ss} , μ_0 , G_0 and λ_{ret} enables us to compare the structure of the Hb gels, yielding a mechanical model with behaviour in response to deformation.

Under dynamic conditions, stress sweeps were performed from 0.01 to 500 Pa at a frequency of 1 Hz, thus showing the linear viscoelastic range of the Hb gels. Temperature sweeps allowed us to ascertain the temperature at which Hb solutions undergo a phase transition from liquid to gel. These sweeps were conducted in the previously established linear viscoelasticity range. In both cases, the frequency employed was 1 Hz and the temperature ramps were carried out as follows: temperature was increased (at a heating rate of 0.6° C/min) from 20° C to 110 °C, subsequently cooling the samples to 0 °C (0.6° C/min). The effect of different temperatures (from 0 to 100 ° C, at a heating rate of 0.6° C/min) on the synthesized gels was then analyzed. These tests were carried out in CS mode at a constant shear stress of 10 Pa. Although experimental detection of the gel point is not easy in practice, Cordobés (Cordobés et al., 2004) suggested that the gel point occurs at the time at which G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) cross each other at a given frequency (Sánchez & Burgos 1997; Pilosof, 2000). The gel point was determined in this way in the present study.

2.5. Chemical analyses

The following parameters were analyzed and determined in each sample in triplicate: pH, using a Crison micropH 2001 pH-meter; humidity, on an HR73 Halogen Moisture Analyzer; protein concentration by means of the Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951); and absorbance, using a Shimadzu UV 1203 UV-Vis spectrophotometer at 500 nm.

2.6. Differential scanning calorimetry (DSC) measurements

Differential scanning calorimetry tests were carried out in hermetically sealed aluminium pans. A DSC 822e apparatus was used, developing temperature ramps from 25° C to 120° C at a heating rate of 0.6° C/min. Subsequently, a second scan from 25° C to 120 ° C was used to check the irreversibility of the reaction changes. The heating rate was approximately the same as that employed in the temperature tests for the reason that the gelling temperature is strongly influenced by the temperature ramp (Donovan et al., 1975). As a well pronounced endothermic peak coincides with the moment of coagulation (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004), the gelation temperature (T_g) of the Hb gels made of fresh solutions was determined in this way. Analyses were carried out in duplicate.

2.7. Particle size determination

Hb gels made of fresh solutions were analyzed on a particle size analyzer (Malvern Mastersizer S) following the procedure described by Worrasinchai (Worrasinchai et al., 2006). Droplet size measurements are reported as the volume-weighted mean diameter: $d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$, where n_i is the number of droplets of diameter d_i . In addition, there are two parameters that allow us to determine the degree of dispersion of particle sizes: D10/D50 and D50/D90. When the value of these ratios is equal to unity, the distribution is monodisperse, whereas the system can become highly polydisperse when these ratios tend to be small. Samples of Hb gels were stored at 4° C. Two different samples of each gel were measured, each sample being measured in triplicate.

2.8. Scanning electron microscopy (SEM)

Transversal sections of Hb gels made of fresh solutions were characterized by scanning electron microscopy. All samples, weighing approximately 0.5 g, were submitted to chemical fixation in 0.025 M Phosphate buffer (pH 6.8, Panreac) with 3% glutaraldehyde (v v-1, Panreac). After 1 hour, the samples were washed twice with the same phosphate buffer for 15 minutes. They were then dehydrated by immersion for 15 minutes in aqueous solutions with increasing concentrations of ethanol (20, 40, 60, 80 and 100 (twice) % v/v ethanol in water). Once in absolute ethanol (Panreac), the samples were transferred to 100% acetone (Panreac) in a similar way (30, 50, 70, 90 and 100 (twice) % v/v acetone in ethanol, 10 minutes each solution) and critical point dried with liquid CO₂ (Balzers CPD 030, BAL-TEC AG, Fürstentum, Liechtenstein). Once dried, the samples were assembled on small carbon-tape double-sided aluminium brackets and were bombarded with gold in a vacuum evaporator

(Balzers SCD004, BAL-TEC AG). Finally, they were visualized using a JEOL Deba-6100 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

2.9. *Water Holding Capacity (WHC)*

WHC measurements were conducted by means of centrifugation tests following the method reported by Kneifel (Kneifel et al., 1991). In the present study, 1 g of sample was centrifuged at 20,000xg for 5 min, subsequent to which the amount of water released was weighed. Measurements were carried out in triplicate.

The WHC was characterized in terms of the percentage of water loss in the samples according to the equation reported by Chantrapornchai and McClements (Chantrapornchai & McClements, 2002):

$$\% \text{ loss} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

where m_i is the initial mass of the sample and m_f is the mass after centrifugation.

3. Results and discussion

3.1. *Rheological measurements*

As outlined previously, different rheological measurements were carried out to optimize the development of new products in view of the fact that rheological stability is considered an important quality parameter in these films.

3.1.1. *Temperature sweeps*

During gelation, haemoglobin solutions undergo a phase transition from liquid to gel. The sol-gel transition is a critical point where the transition variable will be related to the pre-treatments of the haemoglobin solutions.

The results obtained from the temperature sweeps are shown in Figure 1. G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) were determined as functions of temperature at a fixed frequency.

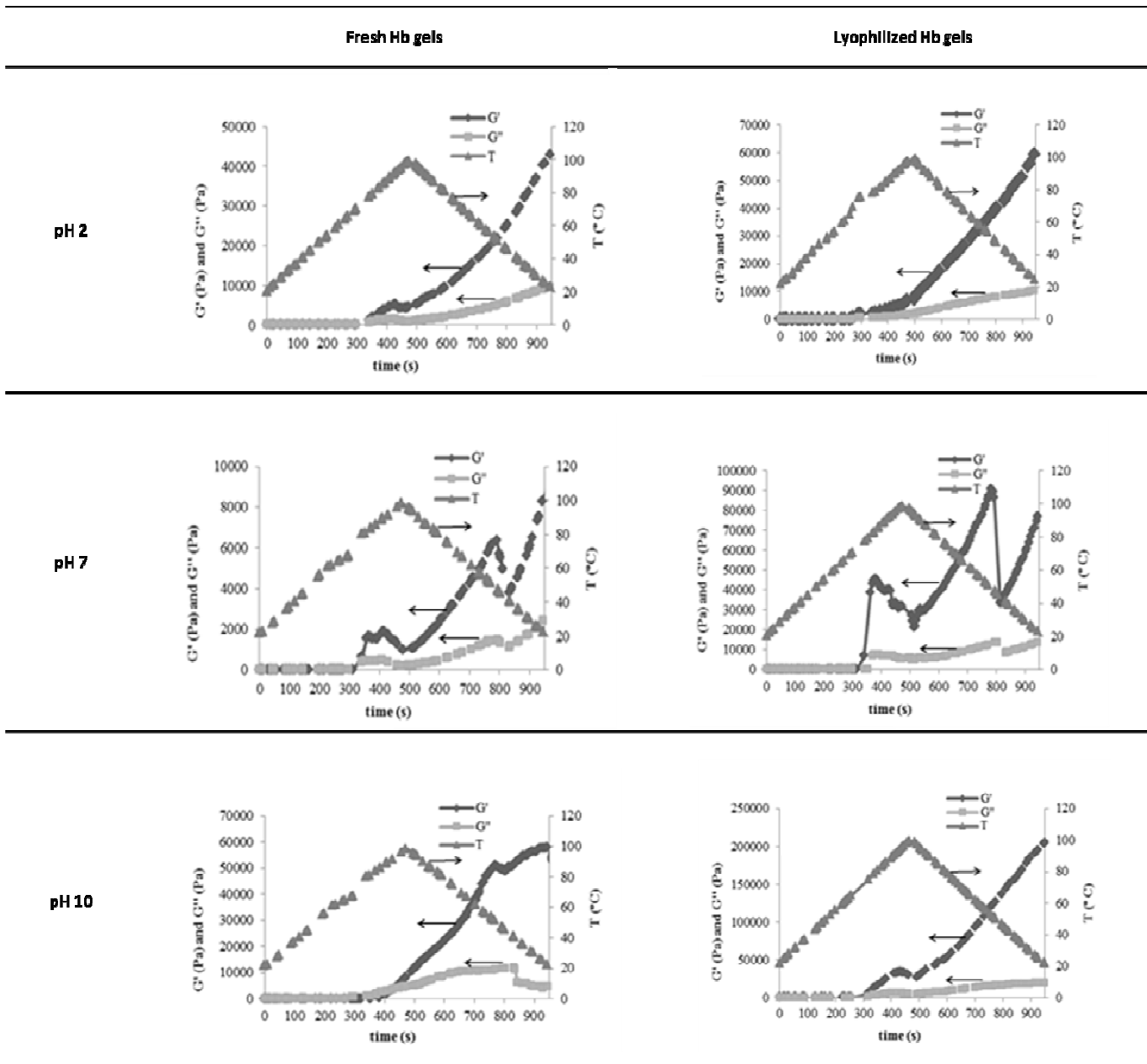


Figure 1. Temperature sweeps of Hb gels made of fresh and lyophilized solutions at pH 2, 7 and 10.

From these figures it can be seen that both G' and G'' values were higher at pH 10. It should also be noted that Hb gels made of lyophilized solutions showed better results than fresh gels. On the other hand, both fresh and Hb gels made of lyophilized solutions at pH 7 showed two significant decreases in the G' and G'' moduli during the heating and cooling ramps.

During heating, the storage (G') and loss (G'') moduli were nearly constant until a certain temperature was reached, at which point G' and G'' increased rapidly, indicating transition from a liquid-like state (sol) to a solid-like state (gel). This temperature is usually taken as the gelation temperature and is one of the common methods to detect the gelling point in the absence of a crossover between G' and G'' (Lamsal et al., 2007). Gel points were determined

in this way for both fresh and lyophilized samples in the present study. The results are shown in Table 2.

Table 2. Gelling points of fresh and Hb gels made of lyophilized solutions by means of temperature sweeps

Hb gel	pH	Gel point (Graphics) (°C)
Made of fresh solutions	2	72.9±0.9
	7	70.2±0.8
	10	60.7±1.2
Made of lyophilized solutions	2	70.2±0.8
	7	71.1±0.7
	10	71.8±0.7

The gelation point increased with decreasing pH for Hb gels made of fresh solutions. However, no significant differences in the gelation point were found in Hb gels made of lyophilized solutions.

Having studied gel formation, the effect of different temperatures (from 0° C to 100 ° C, at a heating rate of 0.6 ° C/min) on the G' and G'' moduli of formed gels was analyzed. These temperatures were chosen to simulate the various situations that these gels might need to support when protecting food products, such as cooling temperatures, room temperatures and the high temperatures that could be reached when protecting thermally processed foods. As can be seen in Figure 2, an important decrease in G' and G'' values was generally observed with increasing temperature. This was seen in films of lyophilized haemoglobin at all studied pH and in fresh haemoglobin at pH 7. However, this was not so in fresh haemoglobin gels at the extreme pH values tested, where the highest values of G'' were reached between 60 and 80 ° C, thus making these films highly suitable gels to protect heat-treated food.

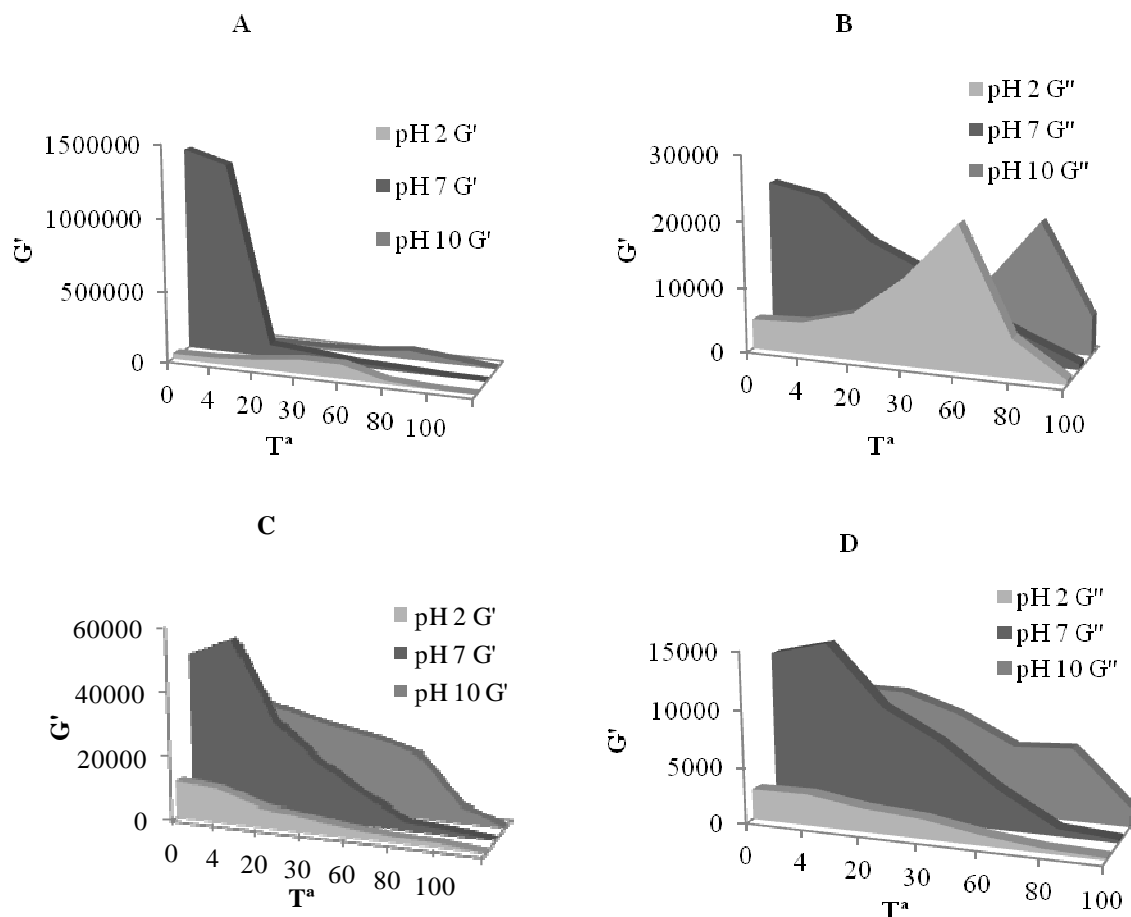


Figure 2. Effect of different temperatures on the G' and G'' moduli of formed gels. G' of Hb gels made of fresh solutions (A), G'' of Hb gels made of fresh solutions (B), G' of Hb gels made of lyophilized solutions (C) and G'' of Hb gels made of lyophilized solutions (D).

3.1.2. Stress sweeps

Stress sweeps were performed from 0.01 to 500 Pa at a frequency of 1 Hz, the results of which are shown in Figure 3. As can be seen, the linear viscoelastic range varies for all the samples between 0 and 60 Pa, approximately. However, it should be borne in mind that the structural strength is higher for gels at pH 7. This different resistance to stresses could be due to the lack of the repulsion charge at neutral pH.

Values of the G' and G'' moduli were lower for lyophilized than for fresh samples, so lyophilization could be responsible for the modification of the gel structure.

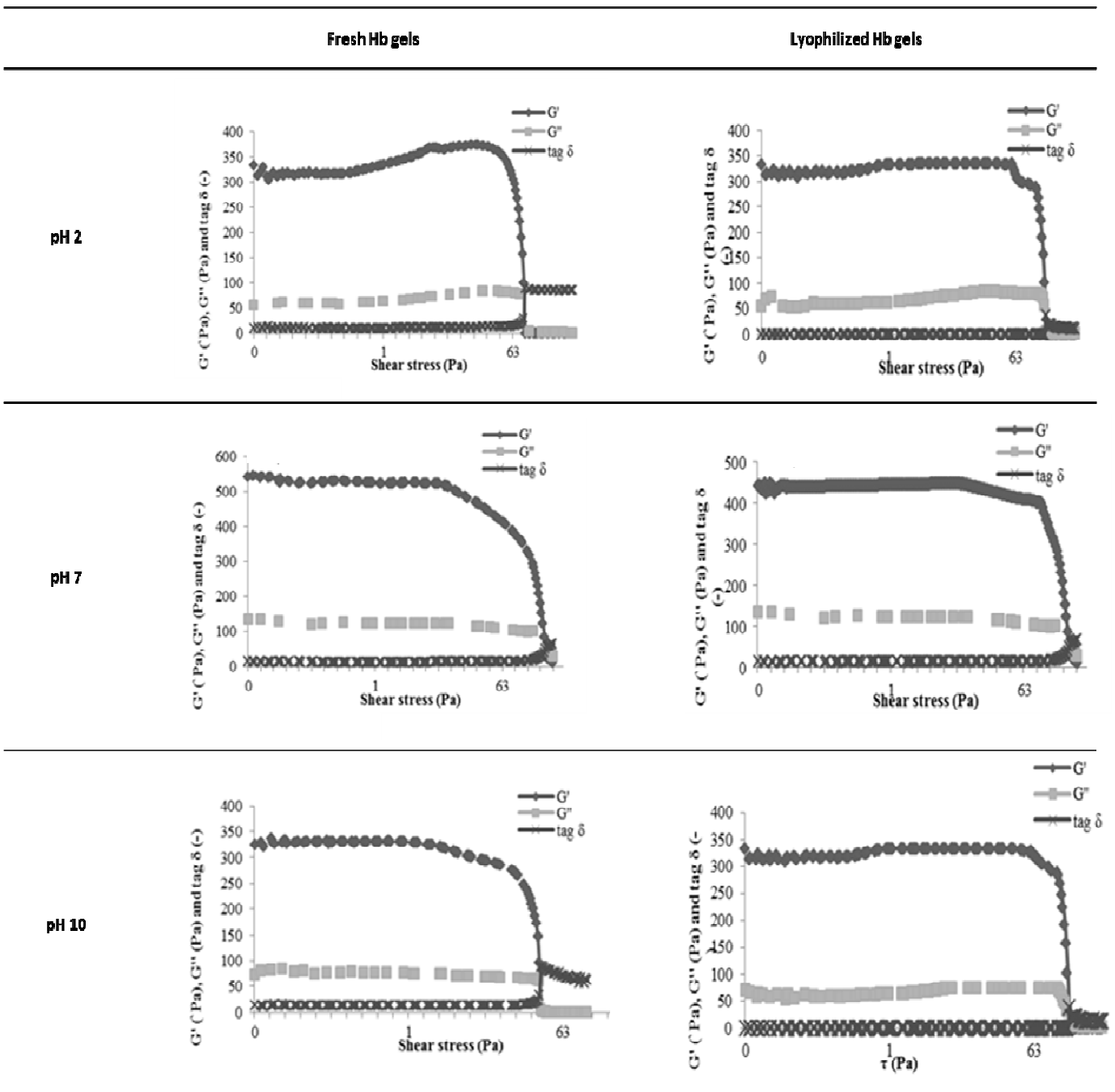


Figure 3. Stress sweeps of Hb gels made of fresh and lyophilized solutions at pH 2, 7 and 10.

3.1.3. Flow curves

Flow curves were carried out in CS mode at $6 \pm 1^\circ \text{C}$ from 0 to 50 Pa of shear stress. Data obtained from the flow curves were fitted to the following equation:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

where τ is the shear stress (Pa), τ_0 the yield point (Pa), $\dot{\gamma}$ the shear rate (s^{-1}), k the consistency coefficient ($Pa \cdot s^n$) and n is the flow behaviour index (dimensionless). The characteristic values of n and k are shown in Table 3. All data display a good correlation with Equation (1) (r^2 values of 0.9919 or higher).

Table 3. Values of the behaviour index (n) and consistency index (k) of fresh and lyophilized gels at different pH. Average values \pm SD are reported

Hb gels	pH	n (dimensionless)	k (Pa.sn)	Fluid
Made of fresh solutions	2	2.881e-01 \pm 0.005	1.516e01 \pm 0.9	Herschel-Bulkley
	7	5.870e-01 \pm 0.04	3.654e+04 \pm 32	Shear-thinning (pseudoplastic)
	10	4.117e-03 \pm 0.0003	2.570e+04 \pm 21	Shear-thinning (pseudoplastic)
Made of lyophil. solutions	2	6.641e-02 \pm 0.002	1.402e+04 \pm 14	Shear-thinning (pseudoplastic)
	7	2.487 \pm 0.4	3.182e+03 \pm 29	Shear-thickening (dilatant)
	10	1.615e-02 \pm 0.008	2.381e+04 \pm 19	Shear-thinning (pseudoplastic)

As established Steffe (Steffe, 1996), values of n and k allow us to classify different types of fluids. These values indicate that most of the Hb gels studied under different pH behaved pseudoplastic (shear thinning). However Hb gels made of fresh solutions at pH 2 exhibited plastic behaviour (Herschel-Bulkley), while Hb gels made of lyophilized solutions at pH 7 behaved as a dilatant. In the former case, this behaviour could be due to acid coagulation, which involves the need to achieve a given threshold stress.

3.1.4. Creep and recovery tests

Creep and recovery tests allow us to understand the internal structure of the gels and the structural variations associated with the introduction of changes in their composition. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at $20 \pm 1^\circ$ C. The recovery tests, also at $20 \pm 1^\circ$ C, lasted 180 seconds.

The fitting of $J = f(t)$, based on the Burger model (2), yielded values of $r^2 \geq 0.991$ in all cases. The values of J_{0s} , μ_0 , G_0 and λ_{ret} are reported in Table 4.

Table 4. Values of the parameters of the Burger model for all the gels studied

Hb gels	pH	J_{0e} (1/Pa)	μ_0 (Pa)	G_0 (Pa)	λ_{ret} (s)	r^2
Made of fresh solutions	2	1.917e-03±0.0001	2.481e+05±320	5.217e+02±4	475.6±5	0.995
	7	5.603e-05±0.000005	5.668e+06±995	1.785e+04±12	317.6±2	0.995
	10	4.827e-04±0.00001	3.898e+05±280	2.071e+03±15	188.2±2	0.998
Made of lyophil. solutions	2	4.675e-05±0.000003	3.742e+06±884	2.139e+04±17	175±2	0.991
	7	5.062e-05±0.000001	4.319e+06±1020	1.975e+04±12	218.6±2	0.999
	10	2.850e-04±0.00006	8.510e+05±785	3.509e+03±11	242.5±2	0.993

These values normally decreased with increasing pH, except for Hb gels made of fresh solutions at pH 2, which underwent acid coagulation. The result is less expected in the case of Hb gels made of lyophilized solutions at pH 2, as they presented the lowest retardation time (λ_{ret}) and the highest values of G_0 . This finding could be explained by the elastic efforts afforded by the molecules of these gels as a result of the combination of lyophilization and acid coagulation.

All the samples showed a viscoelastic response (Figure 4) in view of the fact that they all exhibited a nonlinear response to strain and, due to their ability to recover some structure by storing energy, showed less permanent deformation than the total deformation applied to them (Steffe, 1996). Both fresh and Hb gels made of lyophilized solutions at pH 7 exhibited the greatest resistance to deformation, as the values of the parameters (μ_0 and G_0) of these gels exceed those of all the rest. This could be due to the lower repulsion charge at neutral pH. However, it should be stressed that the results are more favourable for fresh than for lyophilized gels.

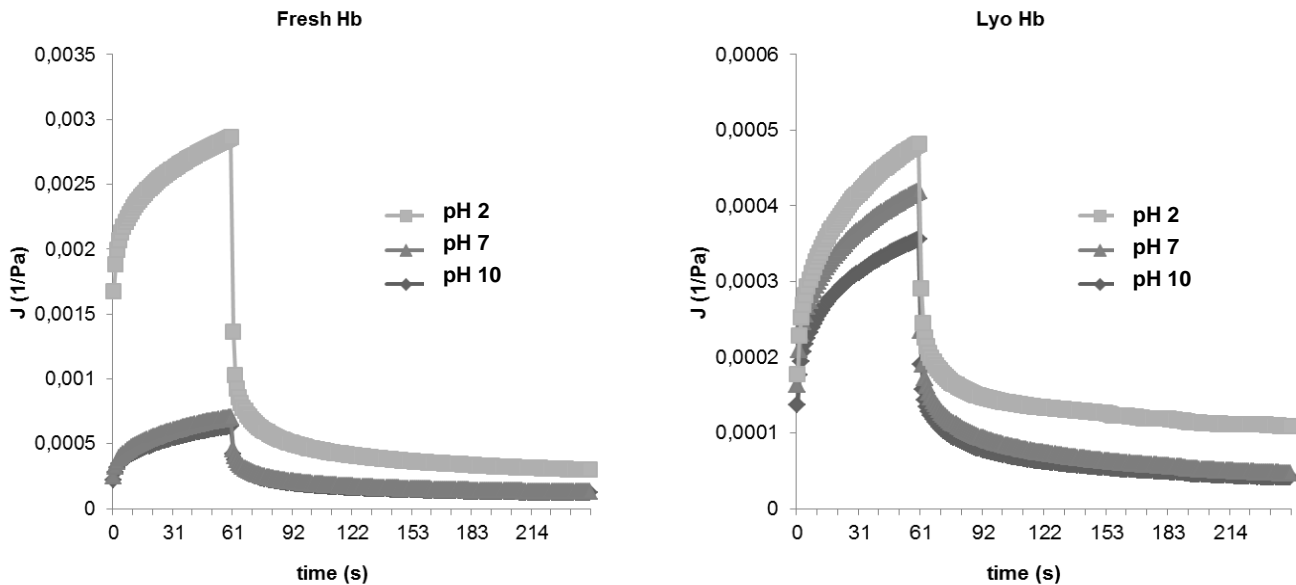


Figure 4. Creep and recovery curves of Hb gel made of fresh and lyophilized solutions at pH 2, 7 and 10.

After 60 seconds of stress application, the system reached maximum deformation for that period of time. The stress was then removed. This allowed us to calculate the percentage of elastic recovery, shown in Table 5. There were no significant differences between fresh and lyophilized gels or for the different pH studied. Lyophilized gel at pH 2 was the exception, with only 17% recovery. Once more, this could be due to the combination of lyophilization and acid coagulation. The remaining gels showed very good elastic recovery.

Table 5. Percentage elastic recovery of fresh and lyophilized gels at different pH

Hb gels	pH	% Elastic recovery
Made of fresh solutions	2	92.04±1.7
	7	89.43±1.2
	10	81.22±0.6
Made of lyophilized solutions	2	17.52±0.05
	7	91.31±1.4
	10	88.53±0.6

Hb gels made of fresh solutions showed better results than lyophilized gels in almost all the tests performed. Thus, the remaining characterization only took into consideration fresh Hb samples.

3.2. Thermal properties

DSC is a widely used technique for studying thermal transitions of food proteins as it provides information on the conversion from the native to the heat-denatured state. This conversion is a phenomenon that is accompanied by a significant uptake of heat, leading to an endothermic peak in the DSC thermogram (Cordobés et al., 2004).

The transition temperatures of Hb gels made of fresh solutions were 80.29 ± 1.9 for gels at pH 2, 72.38 ± 0.8 for gels at pH 7 and 55.78 ± 3.2 for gels at pH 10. Comparing these results with those obtained from temperature sweeps (72.9 ± 0.9 at pH 2, 70.2 ± 0.8 at pH 7 and 60.7 at pH 10), it may be concluded that the gelation point dropped as pH increased. Thus, fresh Hg gels at pH 2 were shown to be more resistant to heat denaturation and subsequent aggregation than gels at higher pH.

3.3. Particle size

In order to determine how the particle size of the gels is affected by pH, Hb gels made of fresh solutions at pH 2, 7 and 10 were studied. Figure 5 shows the size distribution curves of the different gels.

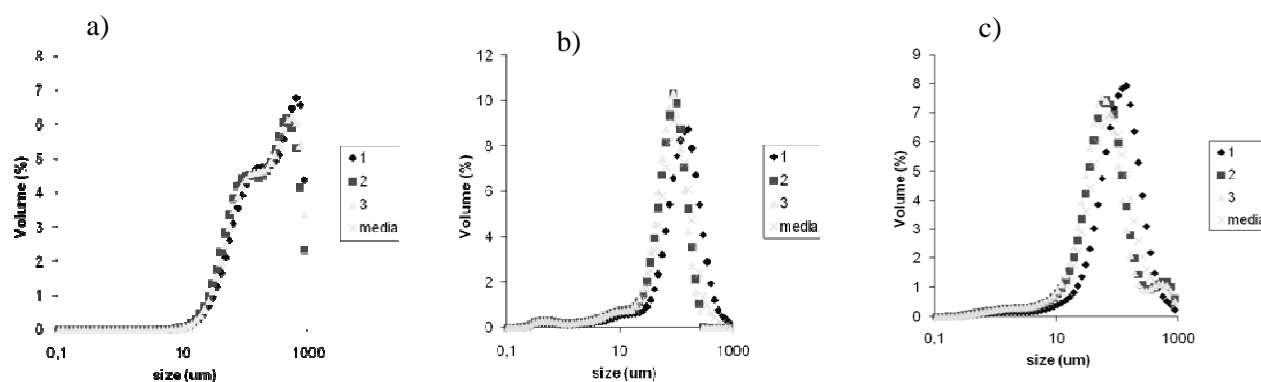


Fig. 5. Size distribution curves for Hb gels made of fresh solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

Size distribution for gels at pH 7 presented a unimodal curve, while size distribution for gels at extreme pH showed bimodal curves. As can be seen in Table 6, an increase was observed in average particle diameter, $d_{4,3}$, at extreme pH. Likewise, the D50/D90 ratio showed that gels

synthesized at extreme pH were more polydisperse than those synthesized at pH 7. However, the D10/50 ratio did not show significant differences.

Table 6. Particle size ($d_{4,3}$, D50/90 and D10/50) of Hb gels made of fresh solutions at the studied pH. Average values \pm SD are reported

Hb gel	pH	$d_{4,3}$ (μm)	D50/D90	D10/D50
Made of fresh solutions	2	278.17 \pm 3	0.33 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02
	7	99.11 \pm 0.8	0.43 \pm 0.04	0.22 \pm 0.02
	10	106.39 \pm 1	0.29 \pm 0.03	0.25 \pm 0.02

3.4. Microstructure

Figure 6 shows the SEM images of Hb gels made of fresh solutions at pH 2, 7 and 10. Important differences in microstructure were found depending on pH. In these images, the grey areas represent protein aggregates while the black spaces show the pores of the network which contain the aqueous phase (Salvador et al., 2008).

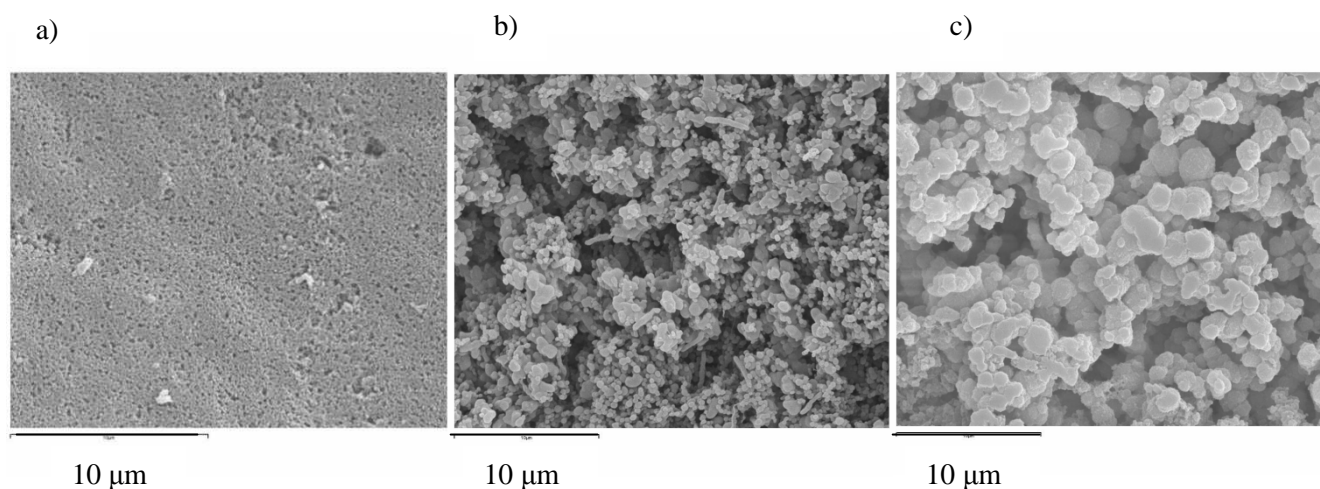


Fig. 6. SEM micrographs of Hb gels made of fresh solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

At pH 2, Hb gels formed a fine network of compact and homogeneous chains. However, gels at pH 7 and 10 were composed of protein aggregates with cavities among them, the size of the cavities being greater with increasing pH. This behaviour could be due to acid coagulation, which affected gels at pH 2.

3.5. Water holding capacity (WHC)

As these gels were developed as films to protect food products, their water holding capacity is one of the most important quality parameters to achieve. The goal in this area depends on the type of food product to protect. In some cases (such as foie gras), the aim is to avoid water loss, almost throughout the product shelf life (more/less than one month), while low humidity and a high water loss is desirable in other cases (such as bakery products).

The results obtained are shown in Table 7 and were fitted to the following equation:

$$\% \text{ loss} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

Table 7. Humidity and WHC (% Loss) for Hb gels made of fresh solutions at pH 2, 7 and 7. Average values \pm SD are reported

	pH	WHC (% loss)		Humidity (%)
		Days		
		1	30	
Hb gel made of fresh solutions	2	40.34 \pm 0.8	42.69 \pm 0.6	78.61 \pm 0.3
	7	40.54 \pm 0.7	47.62 \pm 1.2	92 \pm 1.1
	10	41.38 \pm 1.3	52.38 \pm 0.9	73.48 \pm 0.6

In general, the more open the structure, the lower the WHC (Salvador et al., 2008). This behaviour was hardly noticeable 24 hours after preparing the gels, but after a month it was clear that the % water loss increased with increasing pH.

4. Conclusions

This study shows that haemoglobin gels could be used as films to protect food products. Rheological measurements showed that these gels were more elastic than viscous, which is highly advantageous on account of their subsequent implementation. For most of the studied pH, Hb gels behaved pseudoplastic (shear thinning), i.e. their apparent viscosity decreases with increasing shear stress, presenting very good elastic recovery in almost all cases. Both fresh and Hb gels made of lyophilized solutions at pH 7 exhibited the greatest resistance to deformation. However, in nearly all the rheological tests performed, Hb gels made of fresh solutions showed better results than lyophilized gels. In general, gels at neutral pH showed the best results for all the tests carried out. For instance, gels at pH 7 were more monodisperse than gels at extreme

pH and SEM images revealed that their microstructures were suitable to avoid a high degree of syneresis. On the other hand, the DSC technique corroborated that Hb gels made of fresh solutions at pH 2 were more resistant to heat denaturation and subsequent aggregation than gels at higher pH. In any case, all the Hb gels studied in this paper could be used to preserve the shelf life of food products.

References

- Chantrapornchai, W. & McClements, D.J. 2002. Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 16 (5), 467-476.
- Cordobés, F., Partal, P. & Guerrero, A. 2004. Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels. *Rheol. Acta*, 43, 184-195.
- Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. 2007. Heat induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76, 216-225.
- Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. 2007. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78, 522-528.
- Donovan, J.M., Mapes, C.J. Davis, J.G. & Garibaldi, J.A. 1975. A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 73-83.
- Harris, E. R. V. 1989. *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University.
- Howell, N. K., & Lawrie, R.A. 1984. Functional aspects of blood plasma proteins. II. Gelling properties. *J. Food Technol.*, 19, 289-295.
- Izidoro, D. R., Scheer, A.P., Sierakowski, M. R. & Haminiuk C. W. 2008. Influence of green banana pulp on rheological behavior and chemical characteristics of emulsions (mayonnaises). *LWT- Food Science and Technology* 41 (6), 1018-1028.
- Juszczak, L., Fortuna, T. & Kosla, A. 2003. Sensory and rheological properties of Polish commercial mayonnaise. *Die Nahrung*, 47(4), 232-235.
- Kneifel, W., Paquin, P., Albert, T. & Richard, J.P. 1991. Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects-a review. *J. Dairy Sci.*, 74(7), 2027-2041.
- Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., & Díaz, M. 2009. Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *J. Food Eng.*, 97, 243-252.

- Lamsal, B.P., Jung, S., & Johnson, L.A. 2007. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.
- Murata, M., Tani, F., Higasa, T., Kitabatake, N., & Doi, E. 1993. Heat-induced transparent gel formation of bovine serum albumin. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 57(1), 43-46.
- Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. 1998. *Animal by-product processing and utilization*. Florida, USA: CRC Press.
- Oshodi, A. & Ojokan, E. 1997. Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chem.*, 59, 333-338.
- Parés, D., & Ledward, D. A. 2001. Emulsifying and gelling properties of porcine blood plasma as influenced by high-pressure processing. *Food Chem.*, 74 (2), 139-145.
- Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J., & Carretero, C. 1998. Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influence by pH. *J. Food Sci.*, 63(6), 958-961.
- Rendueles, M., Moure, F., Fernández, A., & Díaz, M. 1996. Preliminary studies on the processing of slaughterhouse blood for protein recovery. *Resource and Environmental Biotechnology*, 1, 193-206.
- Salvador, P., Toldrá, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. 2009. Microstructure- function relationships of heat induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1654-1659.
- Silva, V., & Silvestre, M. 2003. Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 709-718.
- Steffe, J. F. 1996. *Rheological methods in food process engineering*. USA: Freeman Press.
- Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa- Cánovas, G.V. 2005. Rheology for the food industry. *J. Food Eng.*, 67(1-2), 147-156.
- Toldrá, M., Elias, A., Parés, D., Saguer, E. & Carretero, C. 2004. Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure. *Food Chem.*, 88(3), 461-468.
- Wang, C., & Damodaran, S. 1991. Thermal gelation of globular proteins: influence of protein conformation on gel strength. *J. Agric. Food Chem.*, 39(3), 433-438.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., & Jammong, P. 2006. β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 68-78.
- Yasuda, K., Nakamura, R., & Hayakawa, S. 1986. Factors effecting heat-induced gel formation of bovine serum albumin. *J. Food Sci.*, 51(5), 1289-1292.

Decolorized porcine globin gels produced by heat-induced gelation. Physical and rheological characterization

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz *

Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Oviedo, Faculty of Chemistry, C/ Julián Clavería s/n, 33071 Oviedo, Spain.

*Corresponding author. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.

E-mail address: mariodiaz@uniovi.es (M. Díaz)

Abstract

Decolorized porcine globin gels have been developed due to their many potential applications in the area of food technology. In this study they are presented as possible foodstuffs, thickeners or films to cover food products. A precipitating agent and a bleaching agent were used to obtain decolorized globin from hemoglobin. To characterize these films, it was necessary to study their rheology and their resistance to external temperature. Rheological measurements were taken to characterize the gels, in combination with the analysis of their microstructure, particle size, thermal behavior and water holding capacity. Results showed that, G' (the elastic modulus) was higher than G'' (the viscous modulus) and the gelation point decreased with increasing pH for all the samples. Decolorized globin gels behaved dilatantly and presented a viscoelastic response, which was very suitable to form films to cover foodstuffs. DSC analysis corroborated the results obtained from rheological determinations, and size distribution measurements presented unimodal curves for all the films. At acid pH, globin gels were composed of tiny protein aggregates, forming a compact network without spaces between the particles in gels synthesized at pH 2. Gels produced at neutral pH were composed of a few large protein aggregates embedded in a matrix of smaller diameter particles. Furthermore, these gels presented an elevated moisture content and a very high WHC, which are desirable properties due to their potential applications. Decolorized globin gels improve the appearance of previously developed hemoglobin gels as well as improving their rheological properties.

Key words: gel, globin, decolorized, rheology, microstructure.

1. Introduction

Porcine blood obtained in slaughterhouses represents a by-product of the meat industry that can be used in the area of food technology owing to its high protein content (Ockerman & Hansen,

1998; Rendueles et al., 1996). The functional properties of these proteins are comparable to those of egg albumin and whey proteins (Crenwelge et al., 1974). The gelling property is one of the most widely studied features in the area of food science and technology. This ability enables the preparation of many foodstuffs and could even be used to develop new products for covering foods. To carry out the separation of blood proteins, it is necessary to separate the liquid fraction of blood, plasma (Harris, 1989), from the cellular fraction. The main protein in the cellular fraction is hemoglobin (Hb), a globular protein with a molecular weight of 67 kDa composed of four heme groups and four protein subunits. Numerous studies have been published on the functional and physical properties of plasma proteins (Parés et al., 1998; Dávila et al., 2007; Saguer et al., 2008, Del Hoyo et al., 2007). Nevertheless, despite their high potential applicability, gels from decolorized globin have never been prepared.

Globin is the proteic part of hemoglobin. Precipitating and bleaching agents are needed to obtain decolorized globin from hemoglobin solutions. Gels from decolorized globin present a sensorial advantage resulting from their appearance. Up until now, gels from other blood components presented a dark color which could negatively affect their potential uses. In this study, decolorized globin gels were compared with others made from porcine hemoglobin.

The gelation ability is one of the most widely studied features on account of its importance in the area of food science and technology. This property plays a key role in the preparation of many foodstuffs and could even be used to develop new materials for covering foods. Gelation occurs when denatured molecules aggregate to form an organized protein network and it is well known that heat treatment is essential to achieve gelation in the majority of cases. The properties of gels are influenced by many factors, such as pH, protein concentration or pre-treatments of proteins (Silva & Silvestre, 2003). As the presence of salts has been shown to improve gelling capacity (Oshodi & Ojokan, 1997), the porcine blood used in this study was not demineralized.

A heat treatment was needed to prepare these gels and different pH were chosen to simulate the acidity of products such as lemons, plums or some jams (which present a pH of around 2), the neutrality of pork, chicken or fresh fish (pH of around 7) or the basicity of egg whites (pH of around 10).

In this study, a number of rheological measurements were performed for the reason that rheological stability is considered an important quality parameter (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas, 2005). The rheological tests that provided us with information on these gels were the following: temperature sweeps, which allow us to know at what temperature the globin solutions

undergo a phase transition from liquid to gel; stress sweeps, which show us the linear viscoelastic range of the globin gels; flow curves, that enable us to determine the behavior of the samples; and creep and recovery tests, which allow us to understand the internal structure of the gels and the structural variations associated with the introduction of changes in their composition (Dolz et al., 2006).

To complete the characterization of these gels, the rheological results were compared with those obtained from differential scanning calorimetry (DSC). Particle size measurements and SEM images are techniques that also enable us to improve our knowledge of the microstructure of decolorized globin gels.

The aim of this study was the characterization of decolorized globin gels to be used as foodstuffs, thickeners and, above all, films to cover food products. Various rheological tests were developed for this purpose: temperature sweeps, stress sweeps, flow curves and creep and recovery tests. Furthermore, differential scanning calorimetry, particle size measurement and scanning electron microscopy (SEM) determinations were also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Blood

The blood from porcine species used in this study was obtained from the Junquera Bobes slaughterhouse (Noreña, Asturias, Spain). Blood was taken and sodium citrate (Panreac) was quickly added as an anticoagulant at a concentration of 1% w/v. The blood was subsequently centrifuged at 10000xg for 10 minutes in order to separate the plasma (60% in volume) from the cells (40%) in a Kubota 6700 centrifuge using 250 mL tubes. The cellular fraction thus obtained was kept at 4 °C.

2.2. Hemoglobin

Hemoglobin (Hb) was removed by breaking up the erythrocytes by means of osmotic shock, using water in proportion 1:1 v/v for this purpose. Plasmatic membranes were subsequently removed by chemical extraction using an organic solvent (chloroform) in a proportion of 4:1 v/v (chloroform:solution). Hb remains in the aqueous phase, while plasmatic membranes are extracted to the organic phase. The mixture was then centrifuged (Kubota 6700) at 10000xg for 10 minutes, thereby obtaining a supernatant consisting of the aqueous solution of Hb and a precipitate formed by chloroform emulsified with the plasmatic membranes.

2.3. *Decolorized globin*

The Hb solution was added to a stirred tank which was subsequently loaded with ethanol/peroxide (90/10) v/v in a proportion of 3:1 v/v (Hb solution: ethanol/peroxide). The ethanol (absolute ethanol) was used as a precipitating agent and the hydrogen peroxide (100 volumes) as a bleaching agent. The addition was made slowly, stirring constantly so as to allow proper homogenization of the mixture. The process was subsequently left to equilibrate for approximately 30 minutes. The two phases were then separated by means of filtration. The supernatant was discarded as it was composed of ethanol (with the heme group) and the peroxide used in the process. The precipitate was washed twice with distilled water (with approximately 10 times the volume of precipitate) to remove the excess of solvent. The excess of peroxide was then removed with catalase (which was added to a final concentration in the precipitate of 0.25 % w/w) for around 30 minutes. Finally, the precipitate was dried. The whole process to obtain decolorized globin is shown in Figure 1.

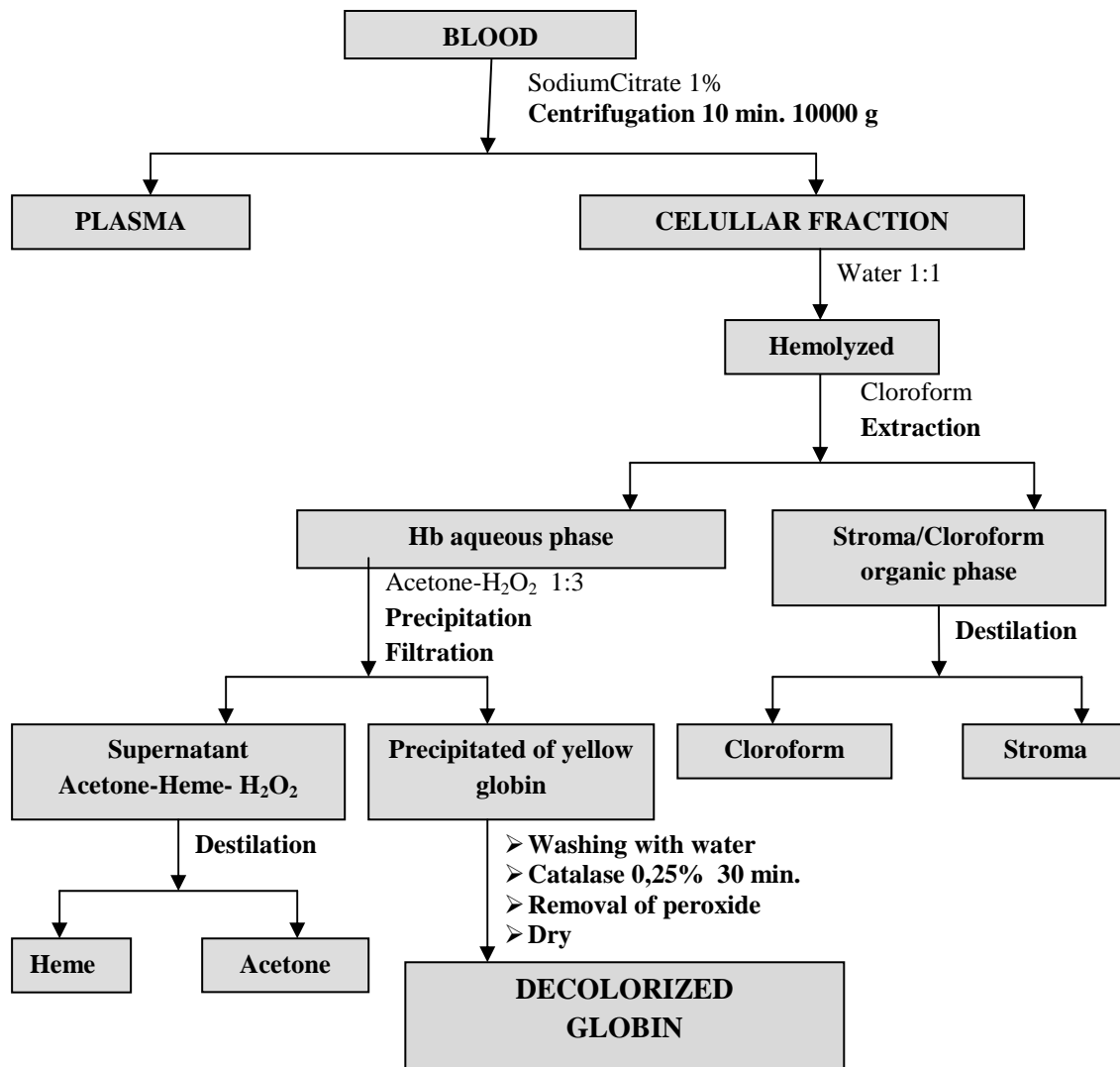


Fig. 1. Decolorized globin production process.

2.4. Preparation of decolorized globin gels

Decolorized globin solutions were dissolved in distilled water to obtain a protein concentration of 14% (w/w) and the pH solutions were adjusted to 2, 7 and 10 with either 0.5M HCl or NaOH. Globin solutions were placed on 80 mm diameter glass plates (TDS Pierron), adding approximately 3 g of solution, and were then heated in an incubator (J.P. Selecta 2000209) at 85 ± 1 °C for 45 min. After heat-induced gelation, samples were immediately cooled to 20 ± 1 °C in 15 min and stored at 4 ± 1 °C before being analyzed.

2.5. Characterization of decolorized globin gels

Several physical and chemical analyses were performed to characterize the decolorized globin gels.

2.5.1. Rheological determinations

Rheological tests were carried out on a Haake MARS II rotational rheometer equipped with a Peltier unit to control the temperature. To avoid slippage, a serrated plate/plate measuring system (PP35) was used, with a gap of 1 mm. All tests (except the temperature tests and flow curves) were carried out at 20 ± 0.1 °C. Before taking any measurement, samples rested for at least 15 min to allow the stresses induced during sample loading to relax (Laca et al., 2009). A glass hood and silicone oil were employed to avoid sample desiccation during the analyses. Samples were analyzed in triplicate.

Steady state flow curves were obtained in Controlled Stress (CS) mode at 6 ± 1 ° C from 0 to 50 Pa of shear stress. These tests allowed us to classify the different types of fluids. A general relationship to describe the behavior of non-Newtonian fluids could be the Herschel Bulkley model (Steffe, 1996):

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad \text{Herschel-Bulkley Law (1)}$$

where τ is the shear stress (Pa), τ_0 the yield point (Pa), $\dot{\gamma}$ the shear rate (s⁻¹), k the consistency coefficient (Pa.sⁿ) and n is the flow behavior index (dimensionless). This equation is very convenient because Newtonian fluids, shear-thinning fluids (when n ranges from 0 to 1), shear-thickening fluids (when n is over 1) and Bingham plastic fluids may be considered special cases of the Herschel-Bulkley model (as can be seen in Table 1).

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear- thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996)

Fluid	k	n	τ_0
Herschel-Bulkley	>0	$0 < n < \infty$	> 0
Newtonian	>0	1	0
Shear-thinning (pseudoplastic)	>0	$0 < n < 1$	0
Shear-thickening (dilatant)	>0	$1 < n < \infty$	0
Bingham plastic	>0	1	> 0

Creep and recovery tests were carried out under transient conditions to study the internal structure of the gel. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at 20 ± 1 ° C. The recovery tests, also at 20 ± 1 ° C, lasted 180 seconds. One of the most widely used models to reflect the deformation of a system is the four-parameter Burger

model, which represents the association of purely elastic or purely viscous behavior in series (Maxwell model) or in parallel (Kelvin-Voigt model). In the Burger model, the system deformation, called compliance (J), corresponds to the following equation (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (2)$$

where J_0 is the instantaneous compliance, J_1 the retarded compliance, λ_{ret} the retardation time (the time required to achieve maximum strain) and μ_0 is the Newtonian viscosity of the free dashpot. The sum of J_0 and J_1 is called the steady state compliance (J_{0e}) and λ_{ret} represents the ratio μ_0/G_0 , where G_0 is the instantaneous elastic modulus of the Maxwell unit.

Obtaining the values of J_{0e} , μ_0 , G_0 and λ_{ret} enables us to compare the structure of the globin gels, yielding a mechanical model showing behavior in response to deformation.

Stress sweeps were performed under dynamic conditions from 0.01 to 500 Pa at a frequency of 1 Hz, thus showing the linear viscoelastic range of the globin gels. Temperature sweeps allowed us to ascertain the temperature at which globin solutions undergo a phase transition from liquid to gel. These sweeps were conducted in the previously established linear viscoelasticity range. In both cases, the frequency employed was 1 Hz and the temperature ramps were carried out as follows: temperature was increased (at a heating rate of 0.6° C/min) from 20° C to 110 °C, subsequently cooling the samples to 0 °C (0.6° C/min). The effect of different temperatures (from 0 to 100 ° C, at a heating rate of 0.6° C/min) on the synthesized gels was then analyzed. These tests were carried out in CS mode at a constant shear stress of 10 Pa. Although experimental detection of the gel point is not easy in practice, Cordobés (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004) suggested that the gel point occurs at the time at which G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) cross each other at a given frequency (Sánchez & Burgos 1997; Pilosof, 2000). The gel point was determined in this way in the present study.

2.5.2. Chemical analyses

The following parameters were analyzed and determined in each sample in triplicate: pH, using a Crison micropH 2001 pHmeter; moisture content, on an HR73 Halogen Moisture Analyzer; protein concentration by means of the Lowry method (Lowry et al., 1951); and absorbance, using a Shimadzu UV 1203 UV-Vis spectrophotometer at 500 nm.

2.5.3. Differential scanning calorimetry (DSC) measurements

Differential scanning calorimetry tests were carried out in hermetically sealed aluminum pans. A DSC 822e apparatus was used, performing temperature ramps from 25° C to 120° C at a heating rate of 0.6° C/min. Subsequently, a second scan from 25° C to 120 ° C was used to check the irreversibility of the reaction changes. The heating rate was approximately the same as that employed in the temperature tests for the reason that the gelling temperature is strongly influenced by the temperature ramp (Donovan et al., 1975). As a marked endothermic peak coincides with the moment of coagulation (Cordobés et al., 2004), the gelation temperature (T_g) of the fresh globin gels was determined in this way. Analyses were carried out in duplicate.

2.5.4. Particle size determination

Globin gels were analyzed on a particle size analyzer (Malvern Mastersizer S) following the procedure described by Worrasinchai (Worrasinchai et al., 2006). Droplet size measurements are reported as the volume-weighted mean diameter: $d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$, where n_i is the number of droplets of diameter d_i . In addition, there are two expressions that allow us to determine the degree of particle size dispersion: D10/D50 and D50/D90, where D50 (equivalent to $d_{4,3}$) is the average particle diameter value and D10 and D90 represent the equivalent diameter when 10 or 90 % of the mass of the powder has a smaller diameter, respectively. When the value of these ratios is equal to unity, the distribution is monodisperse, whereas the system can become highly polydisperse when these ratios tend to be small. Samples of globin gels were stored at refrigerated temperature (4° C). Two different samples of each gel were measured, each sample being measured in triplicate.

2.5.5. Scanning electron microscopy (SEM)

Transversal sections of fresh plasma gels were characterized by scanning electron microscopy. All samples were submitted to chemical fixation in 0.025 M Phosphate buffer (pH 6.8, Panreac) with 3% v/v glutaraldehyde (Panreac) and subsequently dehydrated in aqueous solutions with increasing concentrations of absolute ethanol (Panreac). They were then introduced in increasing concentrations of acetone (Panreac) in a similar way and critical point-dried with liquid CO₂ (Balzers CPD 030, BAL-TEC AG, Fürstentum, Liechtenstein). After drying, the samples were mounted on small carbon-tape double-sided aluminum brackets and were bombarded with gold in a vacuum evaporator (Balzers SCD004, (BAL-TEC AG). Finally, they were viewed under a JEOL Deba-6100 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

2.5.6 Water Holding Capacity (WHC)

WHC measurements were conducted by means of centrifugation tests following the method reported by Kneifel (Kneifel et al., 1991). In the present study, 1 g of sample was centrifuged at 20,000xg for 5 min, subsequently weighing the amount of water released. Measurements were carried out in triplicate.

The WHC was determined in terms of the percentage of water loss in the samples according to the equation reported by Chantrapornchai & McClements (Chantrapornchai & McClements, 2002):

$$\% \text{ loss} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

where m_i is the initial mass of the sample and m_f is the mass after centrifugation.

3. Results and discussion

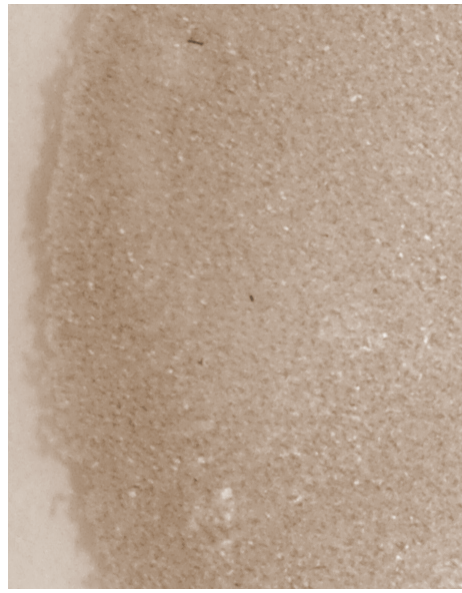
Decolorized globin gels were successfully obtained following the methodology outlined above, presenting different appearances depending on the different experimental conditions employed, as previously indicated in the experimental part of this study.

3.1. Characterization of decolorized globin gels

These gels need to be characterized to reveal their potential applications. First, the appearance of these films was analyzed to check their consistency.

3.1.1. Analysis of the appearance of decolorized globin gels

A photograph of a decolorized globin gel (specifically, a globin gel made from globin solutions at pH 7) is shown in Figure 2. As can be observed, it was a compact gel that could be suitable for covering many foodstuffs, for instance bakery products. Globin gels made from globin solutions in acid and basic media also presented a similar external structure.



30 mm

Fig. 2. Appearance of a decolorized globin gel.

3.1.2. Rheological measurements

Different rheological tests were carried out to optimize the development of these new products, not only as food ingredients or thickeners, but also as films to cover food products. Whatever their potential uses, their rheological stability is considered an important quality parameter.

3.1.2.1. Temperature sweeps

In this study, temperature was increased from 20 °C to 110 °C (at a heating rate of 0.6° C/min), subsequently cooling the samples to 20 °C at the same rate used for heating. During gelation, plasma solutions undergo a phase transition from liquid to gel.

The results obtained from the temperature sweeps are shown in Figures 3. G' (the storage modulus) and G'' (the loss modulus) were determined as functions of temperature at a fixed frequency of 1 Hz. The temperature sweeps demonstrated the temperature dependence of a sample's rheological parameters.

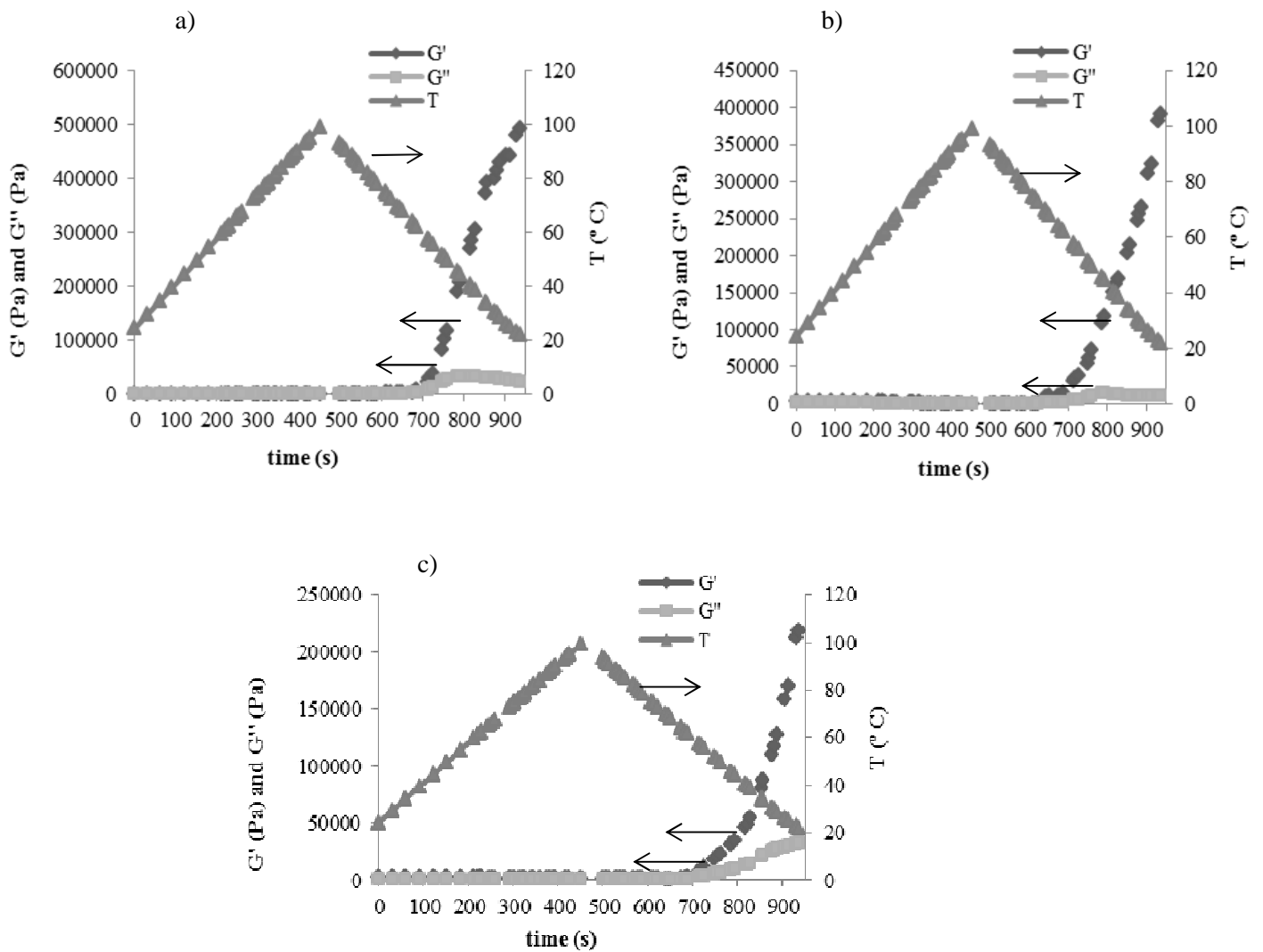


Fig. 3. Temperature sweeps of decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

The results shown in Figure 3 indicate that both moduli, G' and G'' , were higher in decolorized globin gels at pH 2. This means that globin gels synthesized at pH 2 offered the greatest resistance to deformation, a property that is highly advantageous on account of their subsequent use.

During heating, the storage (G') and loss (G'') moduli were nearly constant until a certain temperature was reached, at which point G' and G'' increased rapidly, indicating transition from a liquid-like state (sol) to a solid-like state (gel). This temperature is usually taken as the gelation temperature and is one of the common methods for detecting the gelling point in the absence of a

crossover between G' and G'' (Lamsal et al., 2007). Gel points were determined in this way for all the samples. The results are shown in Table 2.

Table 2. Gelling points of decolorized globin gels by means of temperature sweeps

	pH	Gel point (Graphics) (°C)
Decolorized globin gels	2	66.86±3
	7	62.52±3
	10	56.6±2

The gelation point decreased with increasing pH. As can be observed, there was a difference of approximately 10 ° C between gels prepared under acid conditions and gels prepared under basic conditions.

Having studied gel formation, it is of interest to determine how external temperatures can affect the rheological behavior of the materials. Accordingly, the gels were heated or cooled to different temperatures (from 0° C to 100 ° C, at a heating rate of 0.6 ° C/min) analyzing the G' and G'' moduli of the synthesized gels. These temperatures were chosen to simulate different situations that these gels might need to support when protecting food products, such as refrigerated temperatures, room temperatures and the high temperatures that may be reached when protecting thermally processed foods. As can be seen in Figure 4, significant differences were found for all the samples analyzed.

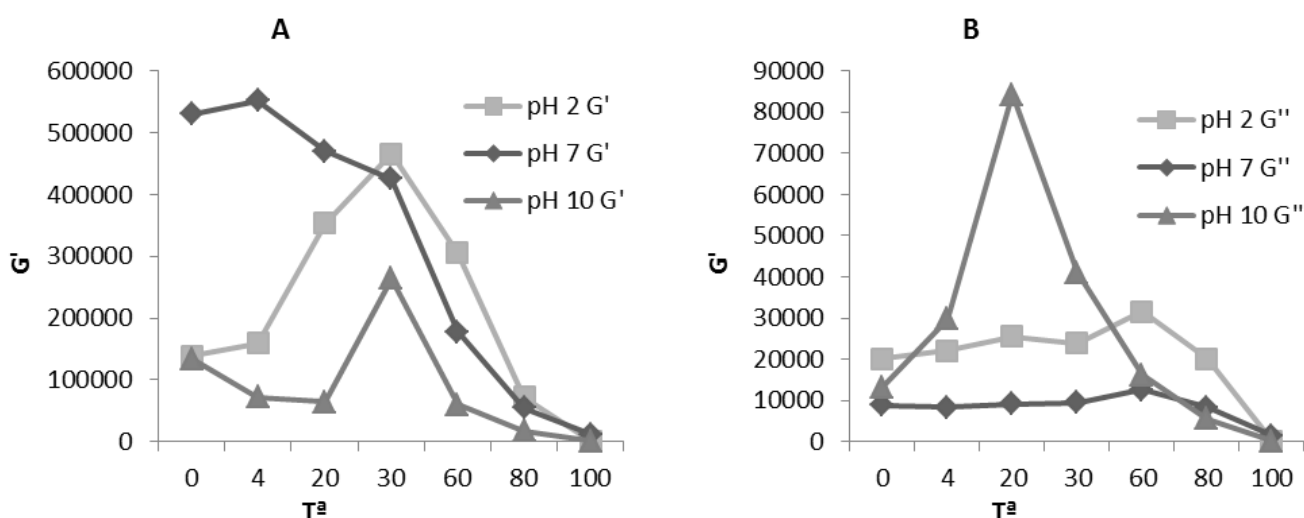


Fig. 4. Effect of different temperatures on the G' (A) and G'' (B) moduli of formed gels.

Under acid and basic conditions, the highest values of G' were obtained at 30 ° C, while at neutral pH a substantial decrease in G' was observed with increasing temperature. Results are quite different for G'' values. At pH 10, the highest values of the viscous modulus were found at 20 ° C, while at lower pH the maximum values were obtained at 60 ° C. Films made from acid and basic globin solutions are thus very resistant at room temperatures. On the other hand, films made from neutral globin solutions were found to be the most resistant, mainly at refrigerated temperatures, making them highly suitable for protecting refrigerated foods.

3.1.2.2. Stress sweeps

Stress sweeps were performed from 0.01 to 500 Pa at a frequency of 1 Hz, the results obtained being shown in Figure 5. As can be seen, the linear viscoelastic range varies for all the samples between approximately 0 and 60 Pa. However, it should be borne in mind that the structural strength is higher for gels produced at pH 7. This different resistance to stress could be due to the lack of a repulsion charge at neutral pH.

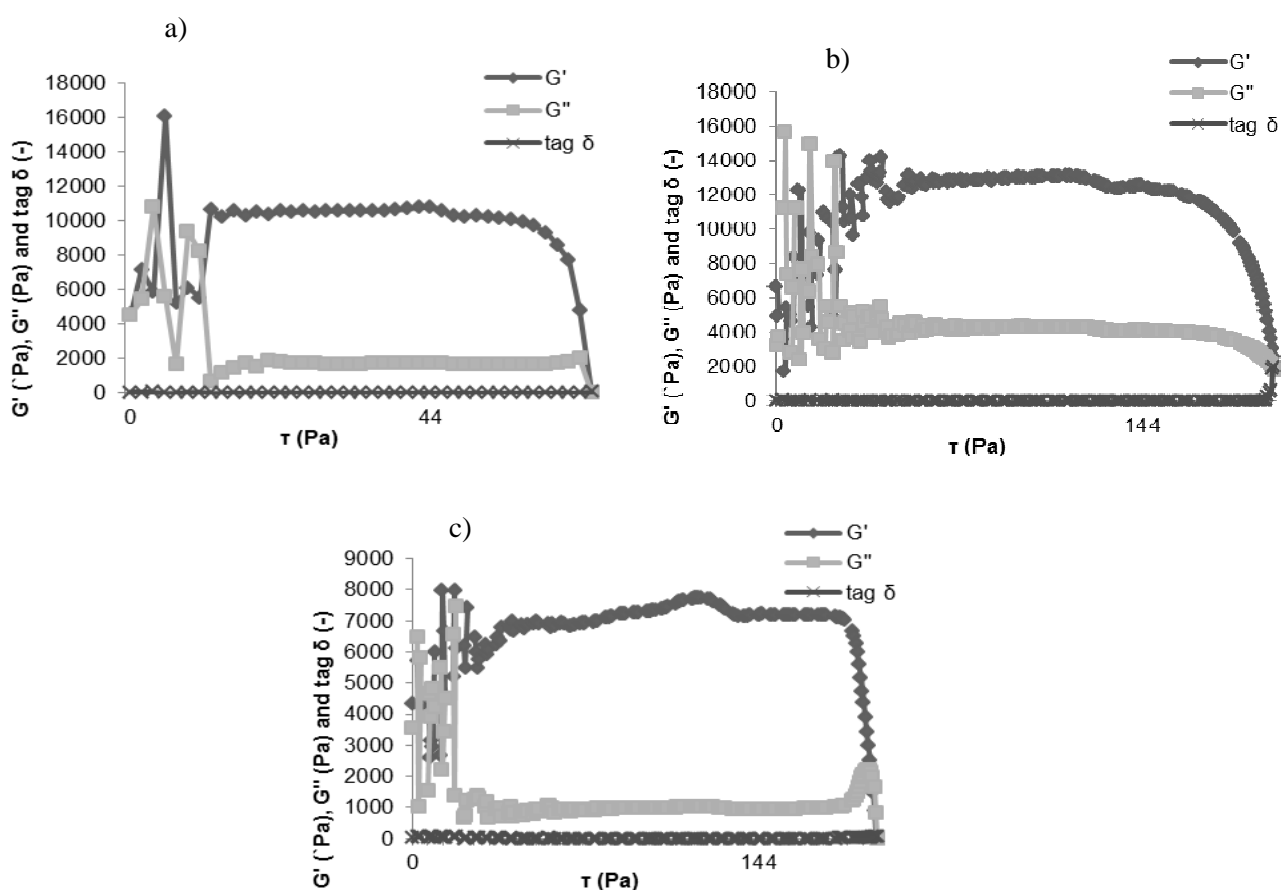


Fig. 5. Stress sweeps of decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

All the samples were found to be more elastic than viscous (the value of G' is higher than that of G''). However, the value of the G' and G'' moduli were lower for gels synthesized at pH 10 than for gels produced at lower pH.

3.1.2.3. Flow curves

Flow curves were carried out in CS mode at $6\pm 1^\circ$ C from 0 to 50 Pa of shear stress. Data obtained from the flow curves were fitted to Equation 1, shown in the experimental section. The characteristic values of n and k obtained are shown in Table 3. All data display a good correlation with Equation (1) (r^2 values of 0.99 or higher).

Table 3. Values of the behavior index (n) and consistency index (k) of decolorized globin gels produced at different pH. Average values \pm SD are reported

	pH	n (dimensionless)	k (Pa.s ^{n})	Fluid
Decolorized globin gels	2	2.783	6.871e+11	Shear-thickening (dilatant)
	7	2.965	1.076e+14	Shear-thickening (dilatant)
	10	5.985	1.436e+23	Shear-thickening (dilatant)

As established by Steffe (Steffe, 1996), the values of n and k allow us to classify different types of fluids. These values indicate that all the globin gels synthesized at different pH in this study behave dilatantly (shear thickening). However, it should be noted that these values increased with increasing pH.

3.1.2.4. Creep and recovery tests

Creep and recovery tests allow us to understand the internal structure of gels and the structural variations associated with the introduction of changes in their composition. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at $20\pm 1^\circ$ C. Subsequent recovery tests were likewise carried out at $20\pm 1^\circ$ C for 180 seconds.

The fitting of $J = f(t)$, based on the Burger model (2), yielded values of $r^2 \geq 0.997$ in all cases. The values of J_{0e} , μ_0 , G_0 and λ_{ret} are reported in Table 4.

Table 4. Values of the parameters of the Burger model for all the gels studied

	pH	J_{0e} (1/Pa)	μ_0 (Pa)	G_0 (Pa)	λ_{ret} (s)	r^2
Decolorized globin gels	2	1.876e-04±0.00002	1.607e+06±602	5.330e+03±8	301.5±2	0.998
	7	1.591e-04±0.00001	1.162e+06±225	6.284e+03±9	184.9±2	0.998
	10	3.299e-04±0.00003	1.511e+06±351	3.031e+03±8	498.4±3	0.997

These values normally increased with extreme pH. However, globin gel produced at pH 7 showed the highest value of G_0 , which could be due to the lower repulsion in the network at neutral pH.

The system reached maximum deformation 60 seconds after applying stress. The application of stress was then discontinued. This allowed us to calculate the percentage of elastic recovery, shown in Table 5.

Table 5. Percentage elastic recovery of fresh and lyophilized globin gels produced at different pH

	pH	% Elastic recovery
Decolorized globin gels	2	92.44 ± 0.8
	7	90.65 ± 1.2
	10	95.23 ± 0.3

All the samples showed a viscoelastic response in view of the fact that they exhibited a nonlinear response to strain. Furthermore, due to their ability to recover some of their structure by storing energy, they showed less permanent deformation than the total deformation applied to them (Steffe, 1996). There were no significant differences between globin gels produced under different pH conditions. However, globin gels synthesized at extreme pH afforded the best recovery results.

3.1.3. Thermal properties

DSC is a widely used technique for studying thermal transitions of food proteins and materials as it provides information on the conversion from the native to the heat-denatured state (Cordobés et al., 2004). Figure 6 shows the thermograms of the fresh decolorized globin gels.

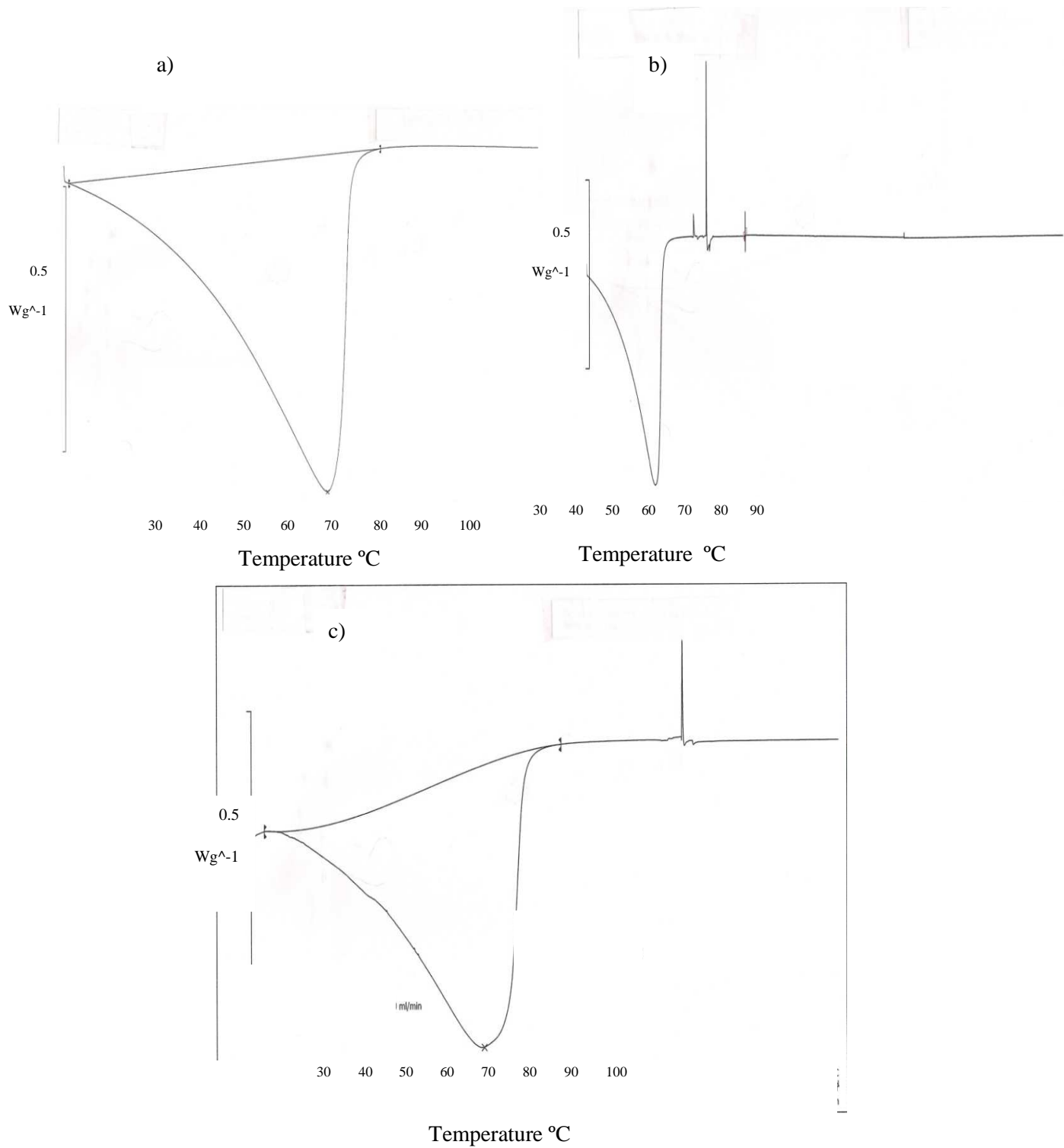


Fig. 6. DSC analysis of decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

The transition temperatures of decolorized globin gels were 69.39 ± 1.2 °C for gels produced at pH 2, 66.07 ± 1.1 °C for gels at pH 7 and 62.92 ± 1.2 °C for gels at pH 10. Comparing these results

with those obtained from temperature sweeps (66.86 ± 3 °C at pH 2, 62.52 ± 3 °C at pH 7 and 56.6 ± 2 °C at pH 10), it may be concluded that the gelation point decreased with increasing pH. Globin gels at pH 2 were thus found to be more resistant to heat denaturation and subsequent aggregation than gels produced at higher pH.

3.1.4. Particle size

In order to determine how the particle size of gels is affected by pH, decolorized globin gels produced at pH 2, 7 and 10 were studied. Figure 7 shows the size distribution curves for the different gels.

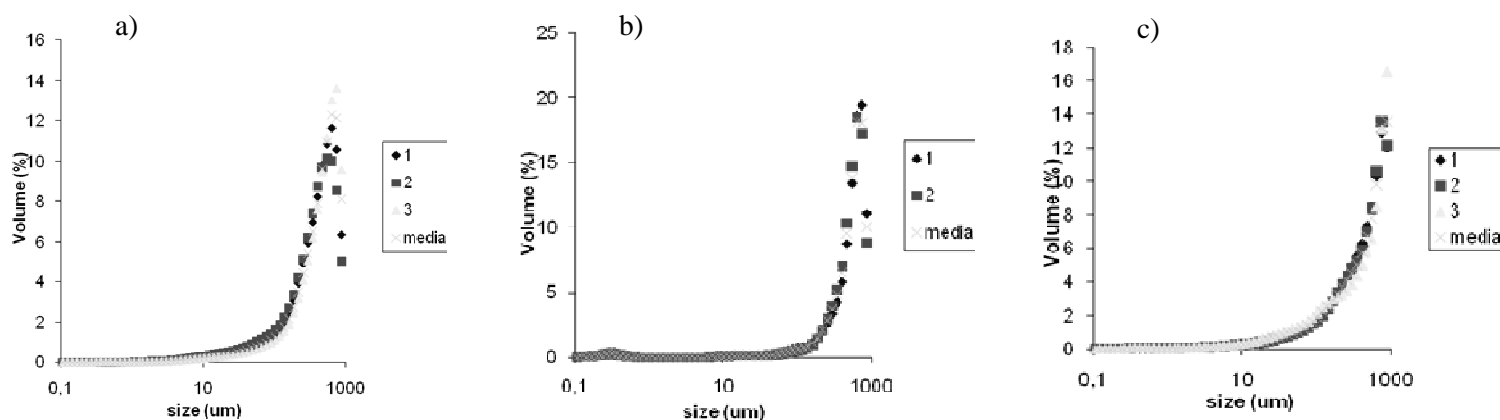


Fig. 7. Size distribution curves for decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

Size distribution for all the samples presented unimodal curves. As can be seen in Table 6, an increase in average particle diameter $d_{4,3}$ at neutral pH was observed (a fact that may be subsequently corroborated in the SEM images). Both the D50/D90 and D10/50 ratios showed that gels synthesized at extreme pH were more polydisperse than gels produced at pH 7.

Table 6. Particle size ($d_{4,3}$, D50/90 and D10/50) of decolorized globin gels produced at the studied pH. Average values \pm SD are reported

	pH	$d_{4,3}$ (μm)	D50/D90	D10/D50
Decolorized globin gels	2	424.23 ± 5	0.58 ± 0.07	0.21 ± 0.02
	7	501.76 ± 5	0.71 ± 0.08	0.35 ± 0.03
	10	422.74 ± 4	0.53 ± 0.1	0.15 ± 0.02

3.1.5. Microstructure

Figure 8 shows the SEM images of decolorized globin gels produced at pH 2, 7 and 10. Important differences in microstructure were found depending on pH. In these images, the grey areas represent protein aggregates, while the black spaces show the pores of the network, which contain the aqueous phase (Salvador et al., 2009).

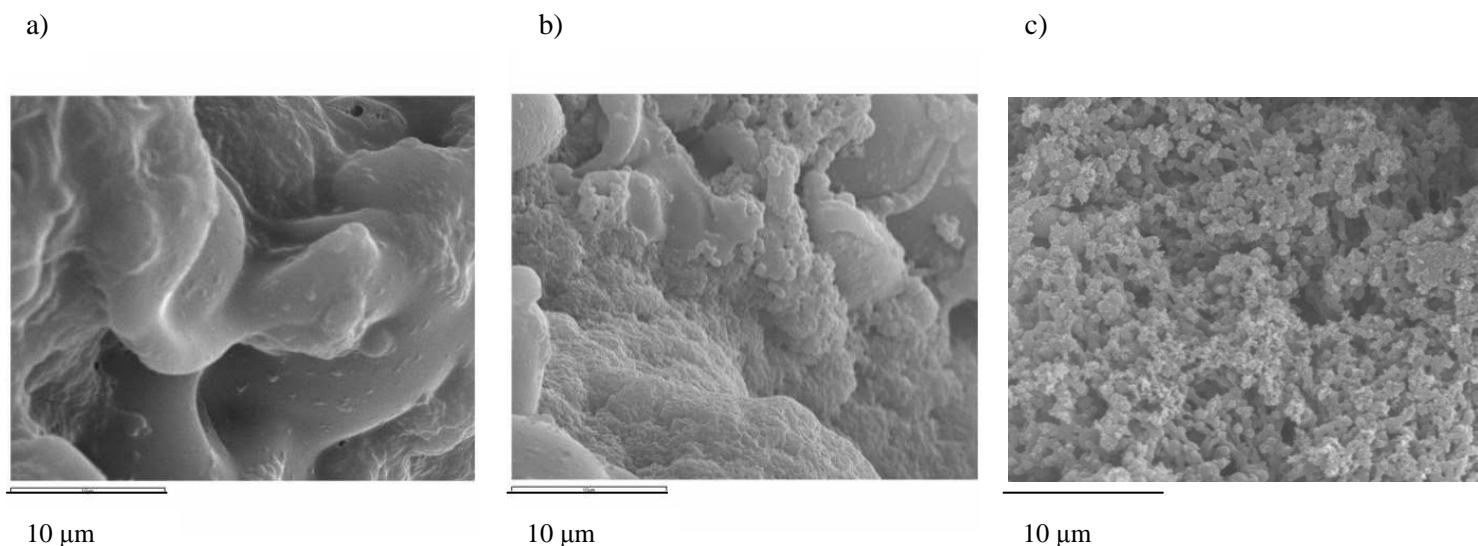


Fig. 8. SEM micrographs of decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

At acid and alkaline pH, the globin gels were composed of tiny protein aggregates; at pH 2, the gels form a compact network without any space between particles. On the other hand, the gels produced at neutral pH were composed of a few large protein aggregates embedded in a matrix of smaller diameter particles. This behavior corroborated the results obtained from particle size analysis.

3.1.6. Water holding capacity (WHC)

As these gels were developed as films to protect food products, their water holding capacity is one of the most important quality parameters to achieve. Depending on the type of the food product to protect, it will be desirable for the gels to present a greater or lesser water holding capacity. In some cases (such as foie gras, for instance), the aim is to avoid water loss throughout the product's shelf life (around one month), while low moisture content and high water loss is desirable in other cases (such as bakery products).

The results obtained are shown in Table 7 and were fitted to Equation 3. In general, the more open the structure, the lower the WHC (Salvador et al., 2009). However, these gels presented a notable water content and a very high WHC (as shown in Table 7). This could be due to their microstructure, which was so compact that the aqueous phase could not escape from the pores of the network.

Table 7. Moisture content and % WHC loss for decolorized globin gels produced at pH 2, 7 and 10. Average values \pm SD are reported

	pH	% loss of WHC		Humidity (%)
		Days		
		1	30	
Decolorized globin gels	2	0	0	78.75 \pm 3
	7	0	0	80.08 \pm 3
	10	0	0	79.16 \pm 3

As outlined previously, a comparison between globin and hemoglobin gels was carried out. In both cases, G' (the elastic modulus) was higher than G'' (the viscous modulus), the gelation point decreasing as pH increased. For most of the studied pH, hemoglobin (Hb) gels behaved pseudoplastically (shear thinning), while all the globin gels behaved dilatantly (shear thickening). This means that Hb gels are more suitable for protecting food products, as their apparent viscosity decreases with increasing shear stress. Globin and Hb gels presented a viscoelastic response, although elastic recovery was better for decolorized globin gels. Size distribution analysis showed unimodal curves for all the globin gels, but not so for Hb films, in which only those gels made from neutral Hb solutions presented a unimodal curve. Both gels made from globin and from Hb at neutral pH were more monodisperse than gels synthesized at extreme pH. However, the most important differences were found in their microstructure. SEM images revealed that their particle distribution was quite different. Globin films produced at neutral pH showed a few large protein aggregates embedded in a matrix of smaller diameter particles. However, Hb gels synthesized at pH 7 were composed of tiny protein aggregates interspersed with cavities. As to WHC, globin gels presented a market moisture content and a very high WHC, while the WHC for Hb gels decreased with decreasing pH.

Taking into account all the aforementioned data, it may be concluded that both gels made from globin and from Hb showed good results from a rheological point of view. However, as these films have been developed to protect food products, their appearance is essential. In this respect,

gels made from decolorized globin displayed a much better appearance than those made from Hb.

3.2. *Potential applications of decolorized globin gels*

The results obtained from the physical and rheological characterization of globin gels showed that these gels could have many applications in the food industry. They could be employed as thickeners due to their good gelling abilities, while the possible use of these gels to cover food products may also be worth noting. This would be possible thanks to their good resistance to deformation, elastic behavior and good WHC.

4. **Conclusions**

Results showed that decolorized globin gels could be used as thickeners and even as films to protect food products. This is possible in view of the fact that G' (the elastic modulus) was higher than G'' (the viscous modulus) for all the samples. Decolorized globin gels produced at pH 7 offered greater resistance to deformation, especially at refrigerated temperatures. DSC (Differential scanning calorimetry) analysis corroborated the results obtained from rheological determinations. For globin gels produced at pH 2, the linear viscoelastic range varies from approximately 0 to 60 Pa. However, for films made from globin solutions synthesized at higher pH, this range reaches 150 Pa. All the globin gels behaved as dilatants (shear thickening) and presented a viscoelastic response, very suitable for forming films to cover foodstuffs. Size distribution measurements showed unimodal curves for all the films, gels synthesized at acid or basic pH being more polydisperse than gels produced at pH 7. Microstructure analysis highlighted important differences. At acid and basic pH, globin gels were composed of tiny protein aggregates, while gels produced at neutral pH were composed of a few large protein aggregates embedded in a matrix of smaller diameter particles. Furthermore, these gels had a notable moisture content and a very high WHC, desirable properties for covering products such as foie gras. The gels produced with decolorized globin have a very good appearance, better than that of gels made from hemoglobin.

5. **Bibliography**

Chantrapornchai, W., McClements, D.J. (2002). Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 16 (5), 467-476.

- Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2007). Heat induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76, 216-225.
- Cordobés, F., Partal, P. & Guerrero, A. (2004). Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels. *Rheological Acta*, 43, 184-195.
- Crenwelge, D., Dill, C., Tybor, P. & Landmann, W. (1974). A comparison of emulsification capacities of some protein concentrates. *Journal of Food Science*, 39(910), 175-177
- Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78, 522-528.
- Dolz, M., Hernández, M. J. & Delegido, J. (2006). Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22, 421-247.
- Donovan, J.M., Mapes, C.J. Davis, J.G. & Garibaldi, J.A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 73-83.
- Harris, E. R. V. (1989). *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University.
- Kneifel, W., Paquin, P., Albert, T., Richard, J.P. & (1991). Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects - a review. *Journal of Dairy Science*, 74(7), 2027-2041.
- Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., & Díaz, M. (2009). Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *Journal of Food Engineering*, 97, 243-252.
- Lamsal, B.P., Jung, S, & Johnson, L.A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Murata, M., Tani, F., Higasa, T., Kitabatake, N., & Doi, E. (1993). Heat-induced transparent gel formation of bovine serum albumin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(1), 43-46.
- Ockerman, H. W. & Hansen, C. L. (1998). *Animal by-product processing and utilization*. Florida, USA: CRC Press.
- Parés, D., Saguier, E., Saurina, J., Suñol, J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influence by ph. *Journal of Food Science*, 63(6), 958-961.

- Rendueles, M., Moure, F., Fernández, A., & Díaz, M. (1996). Preliminary studies on the processing of slaughterhouse blood for protein recovery. *Resource and Environmental Biotechnology*, 1, 193-206.
- Saguer, E., Fort, N., Álvares, P. A., Sedman J., & Ismail, A. (2008). Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. *Food Hydrocolloids* 22(3), 459-467.
- Salvador, P., Toldrá, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2009). Microstructure- function relationships of heat induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1654-1659.
- Silva, V., & Silvestre, M. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36(7), 709-718.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. USA: Freeman Press.
- Oshodi, A. & Ojokan, E. (1997). Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry* 59, 333-338.
- Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa-Cánovas, G.V., (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 147-156.
- Wang, C., & Damodaran, S. (1991). Thermal gelation of globular proteins: influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 433-438.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., & Jammong, P. (2006). β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 68-78.
- Yasuda, K., Nakamura, R., & Hayakawa, S. (1986). Factors effecting heat-induced gel formation of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, 51(5), 1289-1292.

CAPÍTULO 6:
SÍNTESIS DE MATERIALES A PARTIR DE LAS
PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN PLASMÁTICA

6.1. Geles sintetizados a partir del plasma

Este capítulo constituye una continuación del anterior, ya que en él también se analizan los geles desarrollados a partir de las fracciones sanguíneas, siendo en este caso objeto de estudio los geles sintetizados a partir de la fracción plasmática. En concreto incluye dos artículos en los que se muestra el análisis de geles elaborados a partir de soluciones de plasma. En el primero a través de un tratamiento térmico inducido y en el segundo utilizando una sustancia gelificante (glicerol).

En ambos artículos se realiza una caracterización reológica de los nuevos productos y se lleva a cabo un estudio de sus propiedades térmicas, análisis de la distribución granulométrica de sus partículas, microestructura y capacidad de retención de agua. Así mismo, se evalúa si el proceso de liofización afecta a las características reológicas de las muestras.

Rheological characterization and thermal behavior of porcine blood plasma protein gels

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz *

Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Oviedo, Faculty of Chemistry, C/ Julián Clavería s/n, 33071 Oviedo, Spain.

*Corresponding author. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.

E-mail address: mariodiaz@uniovi.es (M. Díaz)

Abstract

Porcine plasma is a by-product with potential applications in the food industry. The production of gels directly from plasma is a good alternative to its valorization from slaughterhouses. In this study, porcine plasma gels prepared under different pH conditions were developed to be used as films to protect food products. To achieve their characterization, the gels were analyzed using rheological measurements in combination with differential scanning calorimetry, particle size measurement and scanning electron microscopy. Rheological studies of the formed gels have not been extensively carried out, but are very important to develop applications of such gels. Results showed that for gels, G' (the elastic modulus) was higher than G'' (the viscous modulus) and the gelation point dropped with decreasing pH. For all the samples, the linear viscoelastic range varied between approximately 0 and 60 Pa, the structural strength being higher for gels synthesized at neutral pH. In general, plasma gels behaved like pseudoplastics (shear thinning) and showed a viscoelastic response.

Key words: gel, plasma, rheology, lyophilization, microstructure.

1. Introduction

The gelling property is one the most widely studied features in the field of food science and technology. This ability enables the preparation of many foodstuffs and could even be used to develop new products for covering foods. Numerous studies have been published on the gelling properties of plasma proteins (Parés, Saguer, Sauriña, Suñol & Carretero, 1998; Dávila, Parés, Cuvelier & Relkin, 2007; Saguer, Fort, Álvares, Sedman & Ismail, 2008). Nevertheless, comprehensive rheological studies of porcine plasma gels have barely been carried out. The gelation ability that blood plasma exhibits is a complex sum of the properties of its individual constituents, the interaction between these and also environmental physicochemical conditions. Gelation occurs when denatured molecules aggregate to form an organized protein network. Moreover, it is widely known that heat treatment is essential to achieve gelation in the majority

of cases. The properties of gels are influenced by many factors such as pH, protein concentration or pre-treatments of proteins (Silva & Silvestre, 2003). As the presence of salts has been found to improve gelling capacity (Oshodi & Ojokan, 1997), the porcine blood used in this study was not demineralized.

Porcine blood is an important by-product of the meat industry with many potential uses. To carry out the separation of blood proteins, it is necessary to separate the liquid fraction of the blood, plasma (Harris, 1989), from the cellular fraction. Plasma is basically made up of proteins (7%), water (91%) and a variety of salts and low molecular weight compounds (1%) (Del Hoyo, Rendueles & Díaz, 2007). Most proteins in blood are found in the plasma, except hemoglobin, which is the major protein in the cellular fraction (Gras, 1983).

Plasma gels have been developed to protect food products. Such gels can be prepared by thermal treatment, which brings about the coagulation of proteins. It is also of interest to study the effect of the pH of the environment on the rheology of the gel to simulate the acidity conditions of products such as lemons, plums or some jams (which present a pH of around 2), the neutrality of pork, chicken or fresh fish (pH of around 7) or the basicity of egg whites (pH of around 10) in the functionality of gels as food protection agents.

Rheology is needed to characterize these new films due to the fact that rheological stability is considered an important quality parameter (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas, 2005). Different rheological tests provide valuable information about these gels. Temperature sweeps allow us to know at what temperature plasma solutions undergo a phase transition from liquid to gel, stress sweeps show the linear viscoelastic range of plasma gels, flow curves enable us to determine the behavior of the samples, while creep and recovery tests allow us to understand the internal structure of the gels and the structural variations associated with the introduction of changes in their composition (Dolz, Hernández & Delegido, 2006). To complete the characterization of these gels, the rheological results were compared with those obtained from differential scanning calorimetry (DSC) and SEM images, enabling us to improve our knowledge of the microstructure of plasma gels.

The aim of this study was the rheological characterization of plasma gels. Gels were prepared using fresh or lyophilized porcine plasma in order to study the differences in the gels depending on the previous state of the plasma. Different rheological tests were developed to characterize the gels, namely temperature sweeps, stress sweeps, flow curves and creep and recovery tests.

Furthermore, differential scanning calorimetry, particle size measurement and scanning electron microscopy (SEM) were also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Plasma

The blood from porcine species used in this study was obtained from the Junquera Bobes slaughterhouse (Noreña, Asturias, Spain). Blood was taken and an anticoagulant such as sodium citrate (Panreac) was quickly added in a concentration of 1% w/v. The blood was subsequently centrifuged at 10000xg for 10 minutes to separate the plasma (60% in volume) from the cells (40%) in a Kubota 6700 centrifuge using 250 mL tubes. The plasma thus obtained was kept at 4° C. Finally, a portion of fresh plasma was freeze-dried to -70 °C and 0.1 mbar in a Telstar Cryodos Lyophilizator. Samples were frozen to -80 °C prior to lyophilization. The dry extract of lyophilized samples was approximately 96 % (w/w).

2.2. Preparation of plasma gels

Fresh and lyophilized plasma solutions were dissolved in distilled water to obtain a protein concentration of 8% (w/w) and the pH solutions were adjusted to 2, 7 and 10 with either 0.5M HCl or 0.5M NaOH. Plasma solutions were placed on 80 mm diameter glass plates (TDS Pierron), adding approximately 3 g of solution, and were then heated in an incubator (J.P. Selecta 2000209) to 85±1 °C for 45 min. After heat-induced gelation, samples were immediately cooled to 20±1 °C for 15 min. and stored at 4±1 °C for 24 hours before being analyzed.

2.3. Rheological determinations

Rheological tests were carried out on a Haake MARS II rotational rheometer equipped with a Peltier unit to control the temperature. To avoid slippage, a serrated plate/plate measuring system (PP35) was used, with a gap of 1 mm. All tests (except the temperature tests and flow curves) were carried out at 20±0.1 °C. Before taking any measurement, samples rested for at least 15 min, allowing the stresses induced during sample loading to relax (Laca, Sáenz, Paredes & Díaz, 2009). A glass hood and silicone oil were employed to avoid sample desiccation during the analyses. Samples were analyzed in triplicate.

Steady state flow curves were obtained in Controlled Stress (CS) mode at 6±1° C from 0 to 50 Pa shear stress. These tests allowed us to classify the different types of fluids. A general relationship

to describe the behavior of non-Newtonian fluids could be the Herschel Bulkley model (Steffe, 1996):

$$\tau = \tau_0 + k\gamma^n \quad \text{Herschel-Bulkley Law (1)}$$

where τ is the shear stress (Pa), τ_0 the yield point (Pa), γ the shear rate (s^{-1}), k the consistency coefficient ($Pa \cdot s^n$) and n is the flow behavior index (dimensionless). This equation is very convenient because Newtonian fluids, shear-thinning fluids (when $0 < n < 1$), shear-thickening fluids (when $1 < n < \infty$) and Bingham plastic fluids may be considered special cases of the Herschel-Bulkley model (as can be seen in Table 1).

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996)

Fluid	k	n	τ_0
Herschel-Bulkley	>0	$0 < n < \infty$	>0
Newtonian	>0	1	0
Shear-thinning (pseudoplastic)	>0	$0 < n < 1$	0
Shear-thickening (dilatant)	>0	$1 < n < \infty$	0
Bingham plastic	>0	1	>0

Creep and recovery tests were conducted under transient conditions to study the internal structure of the gel. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at $20 \pm 1^\circ C$. The recovery tests, also at $20 \pm 1^\circ C$, lasted 180 seconds. One of the most widely used models to reflect the deformation of a system is the four-parameter Burger model, which represents the association of purely elastic or purely viscous behavior in series (Maxwell model) or in parallel (Kelvin-Voigt model). In the Burger model, system deformation, called compliance (J), corresponds to the following equation (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (2)$$

where J_0 is the instantaneous compliance, J_1 the retarded compliance, λ_{ret} the retardation time (the time required to achieve maximum strain) and μ_0 is the Newtonian viscosity of the free dashpot. The sum of J_0 and J_1 is called the steady state compliance (J_{0e}) and λ_{ret} represents the ratio μ_0/G_0 , where G_0 is the instantaneous elastic modulus of the Maxwell unit.

Obtaining the values of J_{0e} , μ_0 , G_0 and λ_0 enables us to compare the structure of plasma gels, yielding a mechanical model showing behavior in response to deformation.

Under dynamic conditions, stress sweeps were performed from 0.01 to 500 Pa at a frequency of 1 Hz, thus revealing the linear viscoelastic range of the plasma gels. Temperature sweeps allowed us to ascertain the temperature at which plasma solutions undergo a phase transition from liquid to gel. These sweeps were conducted in the previously established linear viscoelasticity range. In both cases, the frequency employed was 1 Hz and the temperature ramps were performed as follows: temperature was increased (at a heating rate of 0.6° C/min) from 20° C to 110° C, subsequently cooling the samples to 0° C (0.6° C/min). The effect on the produced gels of different temperatures (from 0 to 100° C, at a heating rate of 0.6° C/min) was then analyzed. These tests were carried out in CS mode at a constant shear stress of 10 Pa. Although experimental detection of the gel point is not easy in practice, Cordobés (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004) suggested that the gel point occurs at the time at which G' (the storage modulus) and G'' (the loss modulus) cross each other at a given frequency. The gel point was determined in this way in the present study.

2.4. *Chemical analysis*

The following parameters were analyzed and determined in each sample in triplicate: pH, using a Crison micropH 2001 pHmeter; humidity, on an HR73 Halogen Moisture Analyzer; protein concentration, by means of the Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951); and absorbance, using a Shimadzu UV 1203 UV-Vis spectrophotometer at 500 nm.

2.5. *Differential scanning calorimetry (DSC) analysis*

Differential scanning calorimetry tests were carried out in hermetically sealed aluminum pans. A DSC 822e apparatus was used, performing temperature ramps from 25° C to 120° C at a heating rate of 0.6° C/min. Subsequently, a second scan from 25° C to 120° C was used to check the irreversibility of the reaction changes. The heating rate was approximately the same as that employed in the temperature tests for the reason that the gelling temperature is strongly influenced by the temperature ramp (Donovan, Mapes, Davis & Garibaldi, 1975). As a marked endothermic peak coincides with the moment of coagulation (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004), the gelation temperature (T_g) of the plasma gels made from fresh solutions was determined in this way. Analyses were carried out in duplicate.

2.6. Particle size determination

Plasma gels made from fresh solutions were analyzed on a particle size analyzer (Malvern Mastersizer S) following the procedure described by Worrasinchai (Worrasinchai, Suphantharika, Pinjai & Jammong, 2006). Droplet size measurements are reported as the volume-weighted mean diameter: $d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$, where n_i is the number of droplets of diameter d_i . In addition, there are two expressions that allow us to determine the degree of particle size dispersion: D10/D50 and D50/D90, where D50 (equivalent to $d_{4,3}$) is the average particle diameter value and D10 and D90 represent the equivalent diameter where 10 or 90 % mass of the powder has a smaller diameter, respectively. When the value of these ratios is equal to unity, the distribution is monodisperse, whereas the system can become highly polydisperse when these ratios tend to be small. Samples of plasma gels were stored at refrigerated temperature (4° C). Two different samples of each gel were measured, each sample being measured in triplicate.

Scanning electron microscopy (SEM)

Transversal sections of fresh plasma gels were characterized by scanning electron microscopy. All samples were submitted to chemical fixation in 0.025 M Phosphate buffer (pH 6.8, Panreac) with 3% v/v glutaraldehyde (Panreac) and subsequently dehydrated in aqueous solutions with increasing concentrations of absolute ethanol (Panreac). They were then introduced in increasing concentrations of acetone (Panreac) in a similar way and critical point-dried with liquid CO₂ (Balzers CPD 030, BAL-TEC AG, Fürstentum, Liechtenstein). After drying, the samples were mounted on small carbon-tape double-sided aluminum brackets and were bombarded with gold in a vacuum evaporator (Balzers SCD004, (BAL-TEC AG). Finally, they were viewed under a JEOL Deba-6100 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

2.7. Water Holding Capacity (WHC)

WHC measurements were conducted by means of centrifugation tests following the method reported by Kneifel (Kneifel, Paquin, Albert & Richard, 1991). In the present study, 1 g of sample was centrifuged at 20,000xg for 5 min, subsequently weighing the amount of water released. Measurements were carried out in triplicate.

The WHC was determined in terms of the percentage of water loss in the samples according to the equation reported by Chantrapornchai & McClements (Chantrapornchai & McClements, 2002):

$$\% \text{ loss} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

where m_i is the initial mass of the sample and m_f is the mass after centrifugation.

3. Results and discussion

Gels were successfully prepared under the different experimental conditions reported in the experimental section. After preparation of the gels, the first step was their rheological and physical characterization. Rheological determinations were carried out first because accurate rheological characterization is crucial for developing adequate processing methodologies to obtain a useful product.

3.1. Rheological measurements

To carry out the rheological characterization of the gels, temperature sweeps were performed first, then stress sweeps followed by flow curves and, finally, creep and recovery tests. The results obtained are presented next.

3.1.1. Temperature sweeps

In this study, the temperature of the gel samples was increased from 20° C to 110° C (at a heating rate of 0.6° C/min) and then decreased to 20° C at the same cooling rate. During gelation, plasma solutions undergo a phase transition from liquid to gel..

The results obtained from the temperature sweeps are shown in Figure 1. G' (the storage modulus) and G'' (the loss modulus) were determined as functions of temperature at a fixed frequency. Temperature sweeps demonstrated the temperature dependence of a sample's rheological parameters.

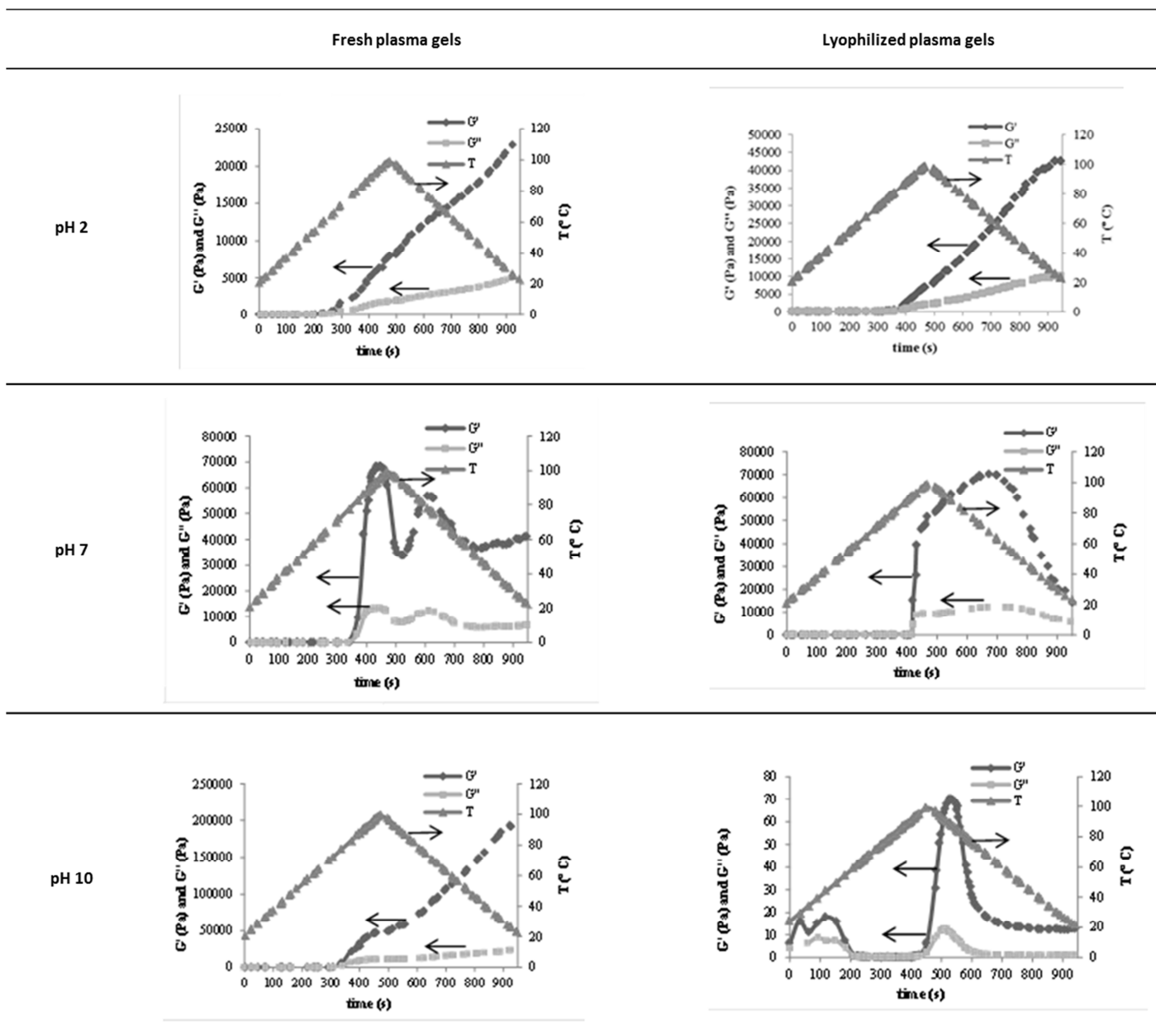


Fig. 1. Temperature sweeps of fresh and lyophilized plasma gels at pH 2, 7 and 10.

The results shown in Figure 1 indicate that both moduli, G' and G'' , were higher in gels made from fresh solutions at pH 10. This means that plasma gels made from fresh solutions at pH 10 offered the greatest resistance to deformation, a property that is highly advantageous in view of their subsequent implementation. However, the results are quite different for films made from lyophilized plasma. Plasma gels made from lyophilized solutions at pH 10 showed the lowest resistance. This could be due to the interrelations between the charge groups at this pH and the lyophilization process. On the other hand, plasma gels made from fresh and lyophilized solutions

at pH 7 showed two significant decreases in the G' and G'' moduli during the heating and cooling ramps.

During heating, the storage (G') and loss (G'') moduli were nearly constant until reaching a certain temperature, at which a rapid increase in G' and G'' is observed. This point indicates the transition point from a liquid-like state (sol) to a solid-like state (gel). The temperature at which this increase in G' and G'' is observed is usually taken as the gelation temperature and is one of the usual methods to detect the gelling point in the absence of a crossover between G' and G'' (Lamsal, Jung & Johnson, 2007). Gel points were determined in this way for samples made from both fresh and lyophilized solutions in the present study. The results are shown in Table 2.

Table 2. Gelling points of plasma gels made from fresh and lyophilized solutions by means of temperature sweeps

	pH	Gel point (Graphics) (° C)
Plasma gels made from fresh solutions	2	68.2±0.2
	7	70.2±0.9
	10	88.8±0.5
Plasma gels made from lyophilized solutions	2	84.5±0.8
	7	87.3±0.5
	10	97.1±0.5

The gelation point decreased with decreasing pH for both types of plasma gels, made from fresh and lyophilized solutions. This behavior has been reported as a consequence of net charge repulsion (Murata, Tani, Higasa, Kitabatake & Doi, 1993) and the formation of β -sheet structures at different temperatures (Wang & Damodaran, 1991; Yasuda, Nakamura & Hayakawa, 1986).

Having studied gel formation, we then studied the effect of temperature on the rheology of the formed gels. To carry out these tests, the gels were heated following a temperature sweep (from 0° C to 100° C, at a heating rate of 0.6° C/min), analyzing the G' and G'' moduli of formed gels. These temperatures were chosen to simulate various actual temperatures that these gels might need to support when protecting food products, such as refrigerated temperatures, room temperatures and the high temperatures that may be reached when protecting thermally processed foods. As can be seen in Figure 2, an important decrease in G' and G'' values was generally observed with increasing temperature. However, this behavior was not observed at pH 10 for samples made from fresh or lyophilized solutions. At this pH, the G' and G'' moduli reached their highest values at around 20° C, which makes these films very suitable for protecting foods at room temperature. It should also be noted that the gels made from lyophilized

solutions prepared at pH 2 achieved the highest values for the G'' modulus at refrigerated (0°C) temperatures, thus making these gels highly suitable films for protecting refrigerated foodstuffs.

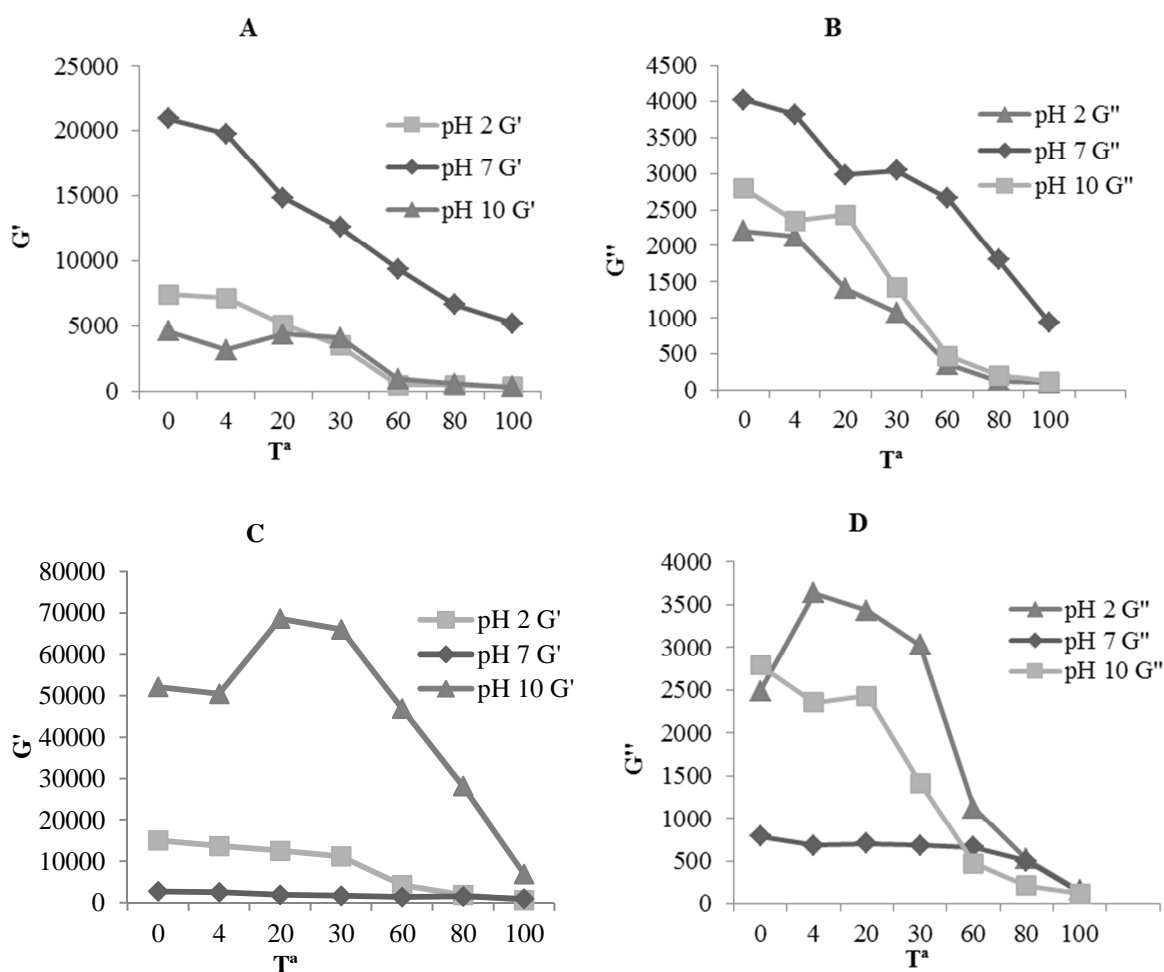


Fig. 2. Effect of different temperatures on the G' and G'' moduli of formed gels. G' of fresh plasma gels (A), G'' of fresh plasma gels (B), G' of lyophilized plasma gels (C), G'' of lyophilized plasma gels (D).

3.1.2. Stress sweeps

Stress sweeps were performed from 0.01 to 500 Pa at a frequency of 1 Hz. The results are shown in Figure 3 for plasma gels made from fresh and lyophilized solutions. As can be seen, the linear viscoelastic range varies for all the samples between approximately 0 and 60 Pa. It can be observed that the structural resistance is higher for gels synthesized at pH 7. This different resistance to stresses could be due to the lack of a repulsion charge at neutral pH.

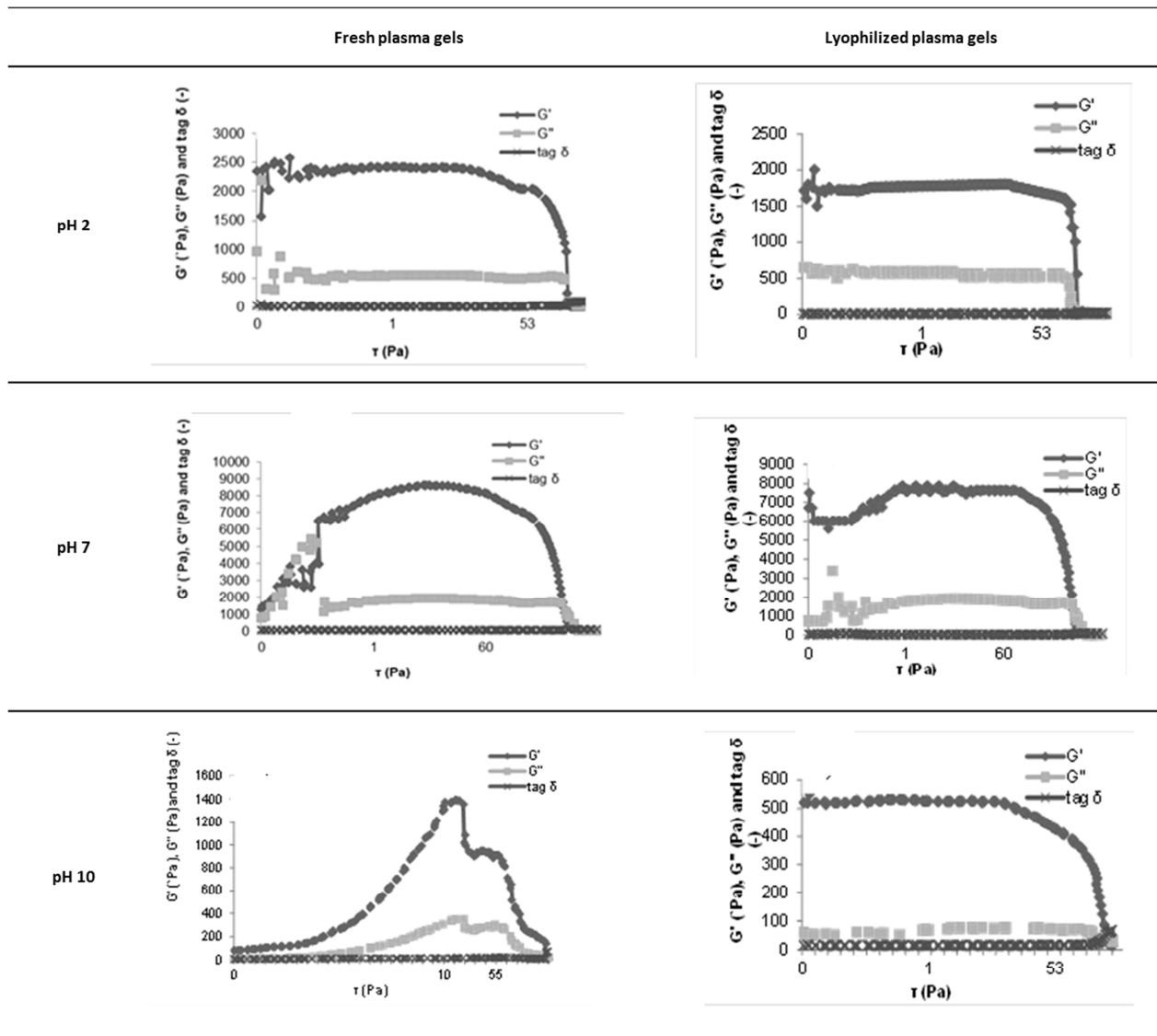


Fig. 3. Stress sweeps of fresh and lyophilized plasma gels at pH 2, 7 and 10.

Gels made from both fresh and lyophilized solutions were found to be more elastic than viscous (the value of G' being higher than that of G''). However, the values of the G' and G'' moduli were generally lower for gels made from lyophilized solutions than for fresh ones.

3.1.3. Flow curves

Flow curves were carried out in CS mode at $6 \pm 1^\circ \text{C}$ from 0 to 50 Pa shear stress. Data obtained from the flow curves and collected by the software of the setup were fitted to Equation 1. The characteristic values of n and k are shown in Table 3. All data show a good correlation with Equation (1) (r^2 values of 0.99 or higher).

Table 3. Values of the behavior index (n) and consistency index (k) of plasma gels made from fresh and lyophilized solutions at different pH. Average values \pm SD are reported

	pH	n (dimensionless)	k (Pa.sn)	Fluid
Plasma gels made from fresh solutions	2	2.114e-03 \pm 0.0002	4.066e+03 \pm 5	Shear-thinning (pseudoplastic)
	7	4.300e-03 \pm 0.0003	1.771e+04 \pm 12	Shear-thinning (pseudoplastic)
	10	1.933e-03 \pm 0.0003	8.907e+03 \pm 25	Shear-thinning (pseudoplastic)
Plasma gels made from lyophilized solutions	2	5.170e-03 \pm 0.0004	9.525e+01 \pm 2	Shear-thinning (pseudoplastic)
	7	5.348e-01 \pm 0.04	3.604e+01 \pm 0.8	Herschel-Bulkley
	10	2.348 \pm 0.1	1.129e+13 \pm 89000	Bingham Plastic

As established by Steffe (Steffe, 1996), the values of n and k allow us to classify different types of fluids. These values indicate that most of the plasma gels synthesized at the studied pH behaved pseudoplastically (shear thinning). However, plasma gels made from lyophilized solutions at pH 7 and 10 exhibited plastic behavior (Herschel-Bulkley). In both cases, this behavior may be due to changes during lyophilization (changes that did not affect gels at pH 2 because of acid coagulation).

3.1.4. Creep and recovery tests

Creep and recovery tests allow us to understand the internal structure of gels and the structural variations associated with the introduction of changes in their composition. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at 20 \pm 1° C. Subsequent recovery tests were also carried out at 20 \pm 1° C, during 180 seconds.

The fitting of $J = f(t)$, based on the Burger model (Equation 2), yielded values of $r^2 \geq 0.98$ in all cases. The values of J_{0e} , μ_0 , G_0 and λ_0 are reported in Table 4.

Table 4. Values of the parameters of the Burger model for plasma gels made from fresh solutions (A) and plasma gels made from lyophilized solutions (B)

	pH	J_{0e} (1/Pa)	μ_0 (Pa)	G_0 (Pa)	λ_0 (s)	r^2
A	2	7.026e-03 \pm 0.0002	1.896e+04 \pm 25	1.423e+02 \pm 2	133.2 \pm 2	0.998
	7	7.822e-04 \pm 0.00001	1.330e+05 \pm 132	1.278e+03 \pm 9	104 \pm 2	0.998
	10	2.633e-02 \pm 0.005	1.698e+04 \pm 22	3.798e+01 \pm 0.1	447.1 \pm 3	0.997
B	2	8.974e-03 \pm 0.0001	8.416e+01 \pm 0.2	1.114e+02 \pm 3	755e-03 \pm 0.004	0.991
	7	1.462e-03 \pm 0.0002	1.067e+05 \pm 165	6.840e+02 \pm 5	156 \pm 2	0.995
	10	5.677e-05 \pm 0.000001	-	1.762e+04 \pm 18	-	0.985

These values normally decreased with increasing pH, though some exceptions can be observed. Changes in retardation time (λ_0) were especially noticeable: the lowest values were reached at pH 7 for plasma gels made from fresh solutions, while this pH yielded the highest values for gels made from lyophilized solutions.

Most samples showed a viscoelastic response considering that they exhibited a nonlinear response to strain and, due to their ability to recover some structure by storing energy, showed less permanent deformation than the total deformation applied to them (Steffe, 1996). However, gels made from lyophilized solutions at pH 2 showed a viscous response.

Plasma gels made from both fresh and lyophilized solutions at pH 7 exhibited the greatest resistance to deformation, the values of the parameters (μ_0 and G_0) of these gels being higher than those obtained at other pH. This could be due to the lower repulsion charge at neutral pH. However, it should be stressed that the results are more favorable for gels made from fresh solutions compared to those obtained from lyophilized solutions.

The system reached maximum deformation 60 seconds after applying stress for the established time period. The application of stress was then discontinued. This allowed us to calculate the percentage of elastic recovery, shown in Table 5. There were no significant differences between gels made from fresh or lyophilized solutions synthesized at neutral pH. However, gels made from lyophilized plasma at pH 2 only presented 0.65% recovery (due to their viscous character), while gels made from lyophilized solutions at pH 10 afforded the worst results, indicating that this is not a very useful product.

Table 5. Percentage elastic recovery of plasma gels made from fresh and lyophilized solutions at different pH

	pH	% Elastic
Plasma gels made from fresh solutions	2	75.09 ± 0.9
	7	75.62 ± 0.2
	10	82.66 ± 1.3
Plasma gels made from lyophilized solutions	2	0.65 ± 0.05
	7	77.94 ± 0.1
	10	-

Plasma gels made from fresh solutions showed better results than lyophilized gels in almost all the tests performed. Accordingly, the remaining characterization only took into consideration

fresh plasma samples made from fresh solutions. It should also be noted that results were generally better for gels synthesized at neutral pH. However, plasma gels made from fresh solutions at pH 10 offered greater resistance to deformation.

3.2. *Thermal properties*

DSC is a widely used technique for studying thermal transitions of food proteins as it provides information on the conversion from the native to the heat-denatured state. This conversion is a phenomenon that is accompanied by a significant uptake of heat, leading to an endothermic peak in the DSC thermogram (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004).

The transition temperatures of plasma gels made from fresh solutions were 68.85 ± 0.9 for gels at pH 2, 68.17 ± 0.7 for gels at pH 7 and 88.08 ± 1.2 for gels at pH 10. Comparing these results with those obtained from temperature sweeps (68.2 ± 0.2 at pH 2, 70.2 ± 0.9 at pH 7 and 88.8 ± 0.5 at pH 10), it may be concluded that the gelation point increased with increased pH. Plasma gels made from fresh solutions at pH 10 were found to be more resistant to heat denaturation and subsequent aggregation than gels synthesized at lower pH.

3.3. *Particle size analysis*

In order to determine how the particle size of gels is affected by pH, plasma gels made from fresh solutions at pH 2, 7 and 10 were studied. Figure 4 shows the size distribution curves of the different gels.

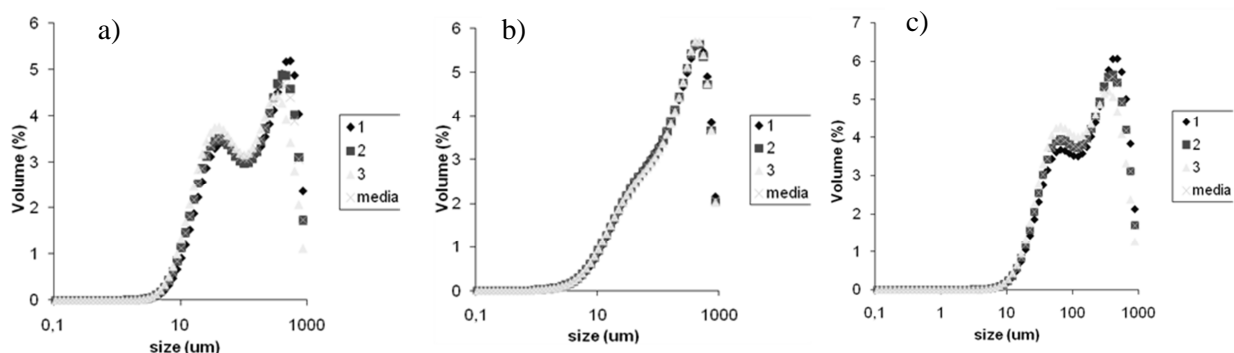


Fig. 4. Size distribution curves for fresh plasma gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

As can be seen in the figure, size distribution for gels at pH 7 presented a more unimodal curve, while size distribution for gels at the other tested pH showed bimodal curves. As seen in Table 6, an increase was observed in average particle diameter $d_{4,3}$ at neutral pH (a fact that can be corroborated with SEM images). However the D10/50 and D50/90 ratios did not show significant differences

Table 6. Particle size ($d_{4,3}$, D50/90 and D10/50) of plasma gels made from fresh solutions at the studied pH. Average values \pm SD are reported

	pH	$d_{4,3}$ (μm)	D50/D90	D10/D50
Plasma gels made from fresh solutions	2	202.52 \pm 2	0.21 \pm 0.04	0.15 \pm 0.02
	7	236.09 \pm 2	0.3 \pm 0.05	0.11 \pm 0.02
	10	227.05 \pm 1	0.29 \pm 0.07	0.19 \pm 0.03

3.4. Microstructure

Figure 5 shows the SEM images of plasma gels made from fresh solutions at pH 2, 7 and 10. Important differences in microstructure were found depending on pH. In these images, the grey areas represent protein aggregates, while the black spaces show the pores of the network, which contain the aqueous phase (Salvador, Toldrá, Saguer, Carretero & Parés, 2009).

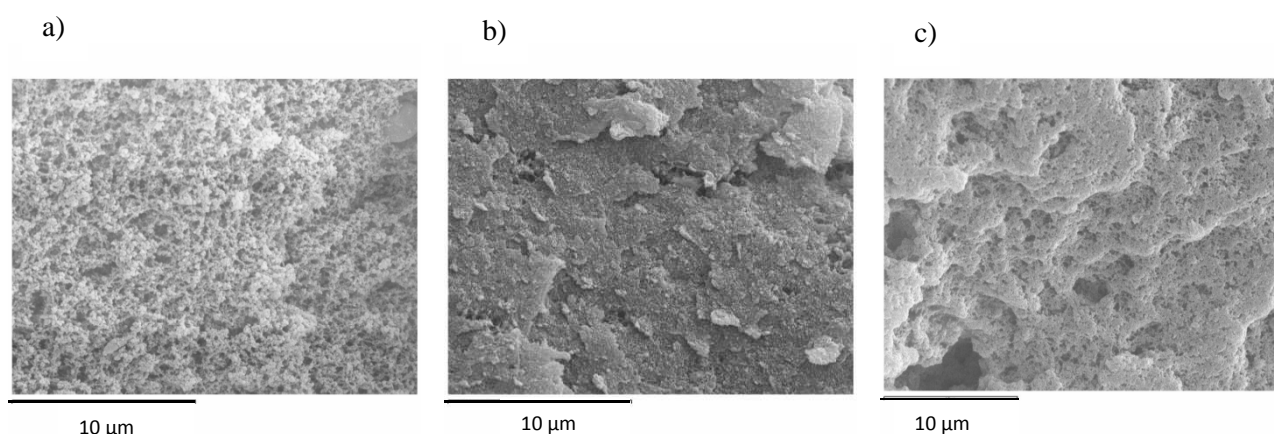


Fig. 5. SEM micrographs of fresh plasma gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

At pH 2 and 10, plasma gels are composed of protein aggregates interspersed with tiny cavities. However, gels at neutral pH formed a fine network of compact chains without any space

between particles. This behavior could be explained because of the more monodisperse network observed at pH 7.

3.5. Water holding capacity (WHC)

As these gels were developed as films to protect food products, their water holding capacity is one of the most important quality parameters to achieve. Depending on the type of the food product to protect, it will be desirable for the gels to present a greater or lesser water holding capacity. In some cases (such as foie gras, for instance), the aim is to avoid water loss throughout the product's shelf life (around one month), while low humidity and a high water loss is desirable in other cases (such as bakery products).

The results of the tests carried out following the methodology reported in the experimental section are summarized in Table 7. The percentage of water loss was calculated using Equation 3. In general, the more open the structure, the lower the WHC (Salvador, Toldrá, Sagner, Carretero & Parés, 2009). This behavior was observed for plasma gels at pH 2 and 7, but for films synthesized at pH 10 the structure was so compact that the aqueous phase could not exit the pores of the network, making the gels prepared at this pH more suitable to avoid water loss.

Table 7. Humidity and % loss of WHC for plasma gels made from fresh solutions at pH 2, 7 and 7. Average values \pm SD are reported

	pH	% loss in WHC		Humidity (%)
		Days		
		1	30	
Plasma gels made from fresh solutions	2	51.55 \pm 3	31.97 \pm 2	87.42 \pm 4
	7	34.52 \pm 3	22.96 \pm 3	67.28 \pm 5
	10	0	0	81.5 \pm 5

3.6. Appearance of plasma gels

The appearance of gels, especially when dealing with a food product, is a key subject that must be taken into account to avoid rejection by consumers. A photograph of a plasma gel (specifically, a plasma gel made from fresh solutions at pH 7) is shown in Figure 6 to illustrate the final appearance of these gels. As can be observed, it was a compact gel with a gelatinous appearance that could be suitable for covering fresh products that need a wet film.



80 mm

Fig. 6. Appearance of a plasma gel.

4. Conclusions

Results show that plasma gels could be used as films to protect food products. Rheological determinations showed that these gels present a G' (elastic modulus) higher than their G'' (viscous modulus). In general, results were better for gels synthesized at neutral pH. However, plasma gels made from fresh solutions at pH 10 offered greater resistance to deformation, a property that is highly advantageous in view of their subsequent implementation. As regards the effect of temperature on formed gels, at pH 10 the G' and G'' moduli reached their highest values at room temperatures, thus making these gels highly suitable films for protecting food products preserved without refrigeration. On the other hand, gels made with lyophilized plasma at pH 2 achieved the highest values for the G'' modulus at refrigerated temperatures. The linear viscoelastic range varies for all the samples between approximately 0 and 60 Pa, the structural strength being higher for gels at pH 7. In general, plasma gels behaved like pseudoplastics (shear thinning) and presented a viscoelastic response. Gels made from both fresh and lyophilized solutions at pH 7 exhibited the greatest resistance to deformation. DSC analysis corroborated that the gelation point decreased with decreasing pH. Size distribution measurements for gels at pH 7 showed a more unimodal curve, while the curves for gels at other pH were found to be bimodal. At extreme pH, plasma gels were composed of protein aggregates interspersed with tiny cavities. However, gels at neutral pH formed a fine network of compact chains without any

space between particles. Furthermore, it generally holds that the more open the structure, the lower the WHC.

5. References

- Chantrapornchai, W., McClements, D.J. (2002). Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 16 (5), 467-476.
- Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2007). Heat induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76, 216-225.
- Cordobés, F., Partal, P. & Guerrero, A. (2004). Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels. *Rheological Acta*, 43, 184-195.
- Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78, 522-528.
- Dolz, M., Hernández, M. J. & Delegido, J. (2006). Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22, 421-247.
- Donovan, J.M., Mapes, C.J. Davis, J.G. & Garibaldi, J.A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 73-83.
- Gras, J. (1983). *Plasma proteins*. Barcelona, Spain: Lims.
- Harris, E. R. V. (1989). *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University.
- Kneifel, W., Paquin, P., Albert, T., Richard, J.P. & (1991). Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects-a review. *Journal of Dairy Science*, 74(7), 2027-2041.
- Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., & Díaz, M. (2009). Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *Journal of Food Engineering*, 97, 243-252.
- Lamsal, B.P., Jung, S, & Johnson, L.A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Murata, M., Tani, F., Higasa, T., Kitabatake, N., & Doi, E. (1993). Heat-induced transparent gel formation of bovine serum albumin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(1), 43-46.

- Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influence by pH. *Journal of Food Science*, 63(6), 958-961.
- Saguer, E., Fort, N., Álvares, P. A., Sedman J., & Ismail, A. (2008). Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. *Food Hydrocolloids* 22(3), 459-467.
- Salvador, P., Toldrá, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2009). Microstructure- function relationships of heat induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1654-1659.
- Silva, V., & Silvestre, M. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36(7), 709-718.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. USA: Freeman Press.
- Oshodi, A. & Ojokan, E. (1997). Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry* 59, 333-338.
- Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa- Cánovas, G.V., (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 147-156.
- Wang, C., & Damodaran, S. (1991). Thermal gelation of globular proteins: influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 433-438.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., & Jammong, P. (2006). β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 68-78.
- Yasuda, K., Nakamura, R., & Hayakawa, S. (1986). Factors effecting heat-induced gel formation of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, 51(5), 1289-1292.

Caracterización reológica de los geles de plasma sintetizados con glicerol

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz *

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, Facultad de Química, C/Julián Clavería s/n, 33071 Oviedo, España

*Autor correspondiente. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.

Dirección de correo electrónico: mariodiaz@uniovi.es (M. Díaz)

Resumen

El plasma porcino es uno de los sub-productos más estudiados por su aplicación potencial en la industria alimentaria. En este trabajo, se han elaborado geles a partir las proteínas sanguíneas utilizando como agente gelificante un alcohol (glicerol). Apenas se han llevado a cabo estudios de caracterización reológica de geles hechos con plasma sanguíneo y glicerol. Estos geles preparados bajo diferentes condiciones (pH y concentración de glicerol) han sido desarrollados para ser usados como posibles películas para proteger productos alimenticios. Para lograr este propósito, se han analizado las características reológicas de los mismos, así como la microestructura y la distribución del tamaño de las partículas de los geles. Los resultados muestran que solamente se forman geles a pH ácido y que los geles sintetizados a una concentración de 50 g de glicerol por 100 g de proteínas plasmáticas son los más resistentes. Además para todas las muestras estudiadas el módulo elástico (G') supera al viscoso (G''). Los geles de glicerol presentan comportamientos tanto pseudoplásticos como dilatantes y los análisis de fluencia y recuperación muestran una respuesta viscosa en todos los casos. Los resultados indican que la mayoría de las partículas presentan tamaños por encima de 100 μm y que, posiblemente debido a la coagulación ácida, se ha formado una fina red de compactas cadenas sin apenas espacio entre las partículas.

Palabras clave: gel, plasma, reología, glicerol, microestructura.

1. Introducción

La capacidad gelificante es una de las propiedades funcionales más relevantes en el campo de la tecnología alimentaria ya que permite mejorar la textura de multitud de productos e incluso podría ser utilizada para desarrollar películas para cubrir alimentos. Se han publicado multitud de artículos sobre las propiedades gelificantes de las proteínas plasmáticas (Parés et al., 1998; Dávila et al., 2007; Saguer et al., 2008, Nuthong et al., 2009); sin embargo, apenas se han llevado a cabo estudios reológicos exhaustivos de los geles desarrollados. La formación de geles ocurre cuando moléculas desnaturalizadas se agregan para formar una red proteica organizada y,

en muchos casos, se hace necesario un tratamiento térmico. En este trabajo, en cambio, se ha utilizado glicerol para formar las redes poliméricas. Se ha escogido este producto ya que frente a otros agentes gelificantes el glicerol ha mostrado una mejor miscibilidad con las proteínas y un mayor poder plastificante (Sothornvit and Krochta, 2001). Además el glicerol no es un producto tóxico (Orliac et al., 2003).

Las propiedades de los geles están influenciadas por factores como el pH, la concentración proteica o los pretratamientos a los que se hayan sometido las proteínas (Silva & Silvestre, 2003). Se ha comprobado que la presencia de sales minerales mejora la capacidad gelificante (Oshodi & Ojokan, 1997).

El plasma porcino es un importante sub-producto de la industria cárnica con multitud de usos potenciales. Para llevar a cabo la separación de las proteínas sanguíneas ha sido necesario separar la fracción líquida, el plasma de la fracción celular (Harris, 1989). El plasma está básicamente compuesto de proteínas (7%), agua (91%) y una variedad de sales minerales y componentes de bajo peso molecular (1%) (Del Hoyo et al., 2007). La mayor parte de las proteínas sanguíneas se encuentran en el plasma, excepto la hemoglobina, que es la proteína más abundante de la fracción celular (Gras, 1983).

La reología es necesaria para caracterizar estos nuevos geles ya que la estabilidad reológica es considerada un importante parámetro de calidad (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas, 2005). Se han llevado a cabo diferentes análisis reológicos que nos han aportado una valiosa información. Tal es el caso de los ensayos de fluencia y recuperación que nos permiten entender la estructura interna de los geles y las variaciones estructurales asociadas a la introducción de cambios en su composición (Dolz et al., 2006), las curvas de flujo que nos muestran el comportamiento de las muestras o el efecto que la temperatura ejerce sobre los módulos elástico y viscoso de los geles. Para completar la caracterización se ha analizado la microestructura de los geles que han resultados más resistentes por medio de microscopía electrónica de barrido y medida del tamaño de las partículas.

En este trabajo se han sintetizado geles de plasma sanguíneo añadiendo glicerol como agente gelificante para formar la red polimérica. Se han empleado diferentes concentraciones de glicerol y en todos los casos se ha analizado la formación de los geles en condiciones ácidas, neutras y básicas. Esto es así porque se ha pretendido simular la acidez de productos como los limones, ciruelas o algunas mermeladas (que presentan un pH alrededor de 2), la neutralidad de la carne de cerdo, pollo o pescado fresco (pH sobre 7) o la basicidad de los huevos blancos (pH en torno

a 10). Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido la caracterización reológica de los geles de plasma sintetizados con glicerol. Para ello se han llevado a cabo diferentes ensayos reológicos tales como curvas de flujo, ensayos de fluencia y recuperación o análisis del efecto de la temperatura. Además, se han empleado técnicas de microscopía electrónica de barrido y medida del tamaño de las partículas.

2. Materiales y métodos

2.1. Plasma

La sangre empleada en este trabajo ha sido de procedencia porcina proveniente del Matadero Central de Asturias Junquera-Bobes (Noreña). La sangre se recogió en un recipiente al que rápidamente se añadió el anticoagulante citrato de sodio (Panreac) en una concentración 1% v/v. Ya en el laboratorio la sangre fue centrifugada a 10000xg durante 10 minutos para separar el plasma (60% del volumen total) de la fracción celular (40%). Para ello se utilizó una centrífuga Kubota 6700 y se emplearon tubos de 250 mL. El plasma obtenido por este procedimiento fue mantenido a 4 ° C.

2.2. Preparación de los geles de plasma con glicerol

El glicerol (de grado absoluto, Panreac) fue añadido a las soluciones de plasma, cuyo contenido proteico fue determinado por el método Lowry (obteniéndose valores de 7.35 ± 0.2 g/100mL), hasta lograr concentraciones de 30, 50, 70, 200 y 500g de glicerol/100g de proteínas plasmáticas. Las mezclas fueron agitadas durante 5 min. a temperatura ambiente, siendo posteriormente ajustadas a pH 2, 7 y 10 con HCl 0.5M o NaOH 0.5M. A continuación, fueron colocadas en placas de cristal de 80 mm de diámetro (TDS Pierron) añadiendo aproximadamente 3 g de solución en cada una. Finalmente, fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 horas.

2.3. Determinaciones reológicas

Los análisis reológicos han sido llevados a cabo utilizando un reómetro rotacional (Haake MARS II) con un sistema Peltier para control de la temperatura. Antes de comenzar cada medida las muestras se han dejado estabilizar al menos 15 min., contrarrestando así el estrés inducido durante la carga de las mismas (Laca et al., 2009), y para evitar la desecación durante los análisis se han empleado aceite de silicona y cubiertas de cristal. Las muestras se han analizado por triplicado.

En estado estacionario, las curvas de flujo se han llevado a cabo en modo de estrés controlado CS (Controlled Stress) a $6\pm 1^\circ\text{C}$ de 0 a 50 Pa de esfuerzo cortante. Estos análisis nos permiten clasificar los diferentes tipos de fluidos. La ley de Herschel- Bulkley (Steffe, 1996) puede considerarse como un modelo para describir el comportamiento de los fluidos no Newtonianos:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad \text{Ley de Herschel-Bulkley (1)}$$

dónde τ es el esfuerzo cortante (Pa), τ_0 es el punto de fluencia (Pa), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (s^{-1}), k es el coeficiente de consistencia ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$) y n es el índice de comportamiento (adimensional). Esta ecuación es muy conveniente ya que los fluidos Newtonianos, los pseudoplásticos (cuando $0 < n < 1$), los dilatantes ($1 < n < \infty$) y los plásticos de Bingham pueden considerarse casos especiales del modelo de Herschel-Bulkley (como puede observarse en la Tabla 1).

Tabla 1. Fluidos Newtoniano, dilatante, pseudoplástico y plástico Bingham como casos especiales del modelo Herschel-Bulkley (Steffe, 1996)

Fluido	k	n	τ_0
Herschel-Bulkley	>0	$0 < n < \infty$	>0
Newtoniano	>0	1	0
Pseudoplástico	>0	$0 < n < 1$	0
Dilatante	>0	$1 < n < \infty$	0
Plástico-Bingham	>0	1	>0

En condiciones transitorias, los ensayos de fluencia y recuperación nos permiten comprender la estructura interna de los geles. En los análisis de fluencia se aplicó a la muestra un esfuerzo instantáneo de 40 Pa durante 60 segundos a $20\pm 1^\circ\text{C}$. Los de recuperación, también a $20\pm 1^\circ\text{C}$., duraron 180 segundos. Uno de los modelos que mejor refleja la deformación de un sistema es el modelo de Burger de cuatro componentes, ya que representa la asociación del comportamiento puramente elástico o puramente viscoso en series (modelo de Maxwell) o en paralelo (modelo Kelvin-Voigt). En el modelo de Burger, el sistema de deformación llamado complianza, J , corresponde a la siguiente ecuación (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (2)$$

dónde J_0 es la complianza instantánea, J_1 es la complianza retardada, λ_{ret} es el tiempo de retardo (tiempo para alcanzar la máxima deformación) y μ_0 es la viscosidad Newtoniana del amortiguador libre. La suma de J_0 y J_1 es llamada complianza en estado estacionario (J_{10e}) y λ_{ret} representa el cociente $\frac{\mu_0}{G_0}$, dónde G_0 es el módulo instantáneo elástico de la unidad Maxwell. Obteniendo los valores de J_{10e} , μ_0 , G_0 y λ_{ret} podemos comparar la estructura de los geles, ya que nos proporciona un modelo mecánico responsable de la deformación.

En condiciones dinámicas se ha estudiado el efecto de diferentes temperaturas sobre los geles ya formados. En concreto se han ensayado temperaturas desde 0 a 100 ° C, con una tasa de calentamiento de 0.6° C/min. Estos análisis se han llevado a cabo en modo CS a un constante esfuerzo cortante de 10 Pa.

2.4. *Análisis químicos*

Los siguientes parámetros han sido analizados y determinados en cada muestra por triplicado: pH, usando un pHmetro Crison micropH 2001; concentración proteica a través del método de Lowry (Lowry et al., 1951); y absorbancia usando un espectrofotómetro Shimadzu UV 1203 UV-Vis a 500 nm.

2.5. *Determinación del tamaño de las partículas*

Los geles más resistentes fueron analizados por un analizador del tamaño de las partículas (Malvern Mastersizer) siguiendo el procedimiento descrito por Worrasinchai (Worrasinchai y cols., 2006). La medida del tamaño de las partículas se presenta como el diámetro de volumen medio ponderado: $d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$, dónde n_i es el número de partículas de diámetro d_i . Además hay dos parámetros que nos permiten determinar el grado de dispersión de tamaños de partículas: D10/D50 y D50/D90. La distribución es monodispersa cuando el cociente entre estos índices es igual a la unidad, por el contrario un sistema puede ser muy polidisperso cuando las relaciones entre ellos tienden a ser pequeñas. Las muestras de los geles de plasma con glicerol se almacenaron a temperatura de refrigeración (4 ° C). Se analizaron dos muestras diferentes de cada gel y cada muestra se midió por triplicado.

2.6. *Microscopía electrónica de barrido*

Se caracterizaron secciones transversales de los geles por microscopía electrónica de barrido. Todas las muestras, de aproximadamente 0.5 g, fueron sometidas a fijación química en tampón

fosfato 0.025M (pH 6.8, Panreac) con el 3% de glutaraldehído (v/v, Panreac). Tras una hora las muestras fueron lavadas nuevamente dos veces en el mismo tampón fosfato durante 15 min. A continuación las muestras fueron deshidratadas sumergiéndolas durante 15 minutos en disoluciones acuosas con una concentración creciente de etanol al 96% (Panreac) (20, 40, 60, 80 y 100 (dos veces) % v/v etanol en agua). Una vez en etanol absoluto, las muestras se transfirieron al 100% de acetona (Panreac) de modo similar, sumergiéndolas durante 10 minutos en disoluciones de etanol con una concentración creciente de acetona (30, 50, 70, 90 y 100 (dos veces) % v/v acetona en etanol). Posteriormente las muestras fueron desecadas por punto crítico con CO₂ (Critical Point Dryer Balzers CPD 030, Polaron). Una vez secas las muestras se montaron sobre soportes de aluminio con cinta de carbón adhesiva de doble cara y se bombardearon con oro en un evaporador al vacío (Balzers SCD004, BAL-TEC AG). Finalmente las muestras fueron visualizadas en el microscopio electrónico de barrido JEOL Deba -6100 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

3. Resultados y discusión

Tal y como se indicó en el apartado anterior se desarrollaron geles de plasma sintetizados con diferentes concentraciones de glicerol y bajo distintas condiciones de pH. Una vez preparados, para llevar a cabo su caracterización se realizaron diversos análisis, siendo los primeros de ellos determinadas medidas reológicas que nos permiten optimizar la metodología de su procesado y la calidad final del mismo.

3.1. Efecto del pH

Se han preparado geles de plasma con diferentes concentraciones de etanol bajo distintas condiciones de pH. En concreto, se prepararon geles a pH 2, 7 y 10. Tras 24 horas se observó que únicamente se formaron geles en condiciones ácidas y que a pH neutro y básico las mezclas permanecieron en estado líquido.

3.2. Medidas reológicas

La estabilidad reológica es un importante parámetro de calidad. Por lo tanto, se han realizado diferentes análisis reológicos que nos han permitido comprender la naturaleza de estas nuevas películas para proteger alimentos.

3.2.1. Efecto de la temperatura

Se ha analizado el efecto de diferentes temperaturas (desde 0 a 100° C, a una tasa de calentamiento de 0.6 ° C/min) en los módulos elástico y viscoso una vez formados los geles de plasma con glicerol. Estas temperaturas han sido escogidas para simular diferentes situaciones a las que podrían estar sometidos estos geles al cubrir alimentos. Entre ellas podemos encontrarnos con temperaturas de refrigeración, temperatura ambiente o altas temperaturas que podrían alcanzarse al proteger productos alimenticios tratados térmicamente. Los resultados se muestran en la Figura 1, dónde se puede observar que G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) han sido determinados en función de la temperatura a una frecuencia fija. En todos los casos, el módulo elástico supera al viscoso y, en general, se observa un descenso en G' y G'' al incrementarse la temperatura. La excepción a esto último la constituyen los geles sintetizados con una concentración de glicerol de 50 g/100 g de proteínas plasmáticas, que por otro lado son las más resistentes. Estos geles muestran los valores más altos de ambos módulos alrededor de 60° C, lo cual los convierte en sumamente adecuados para proteger productos alimenticios tratados térmicamente.

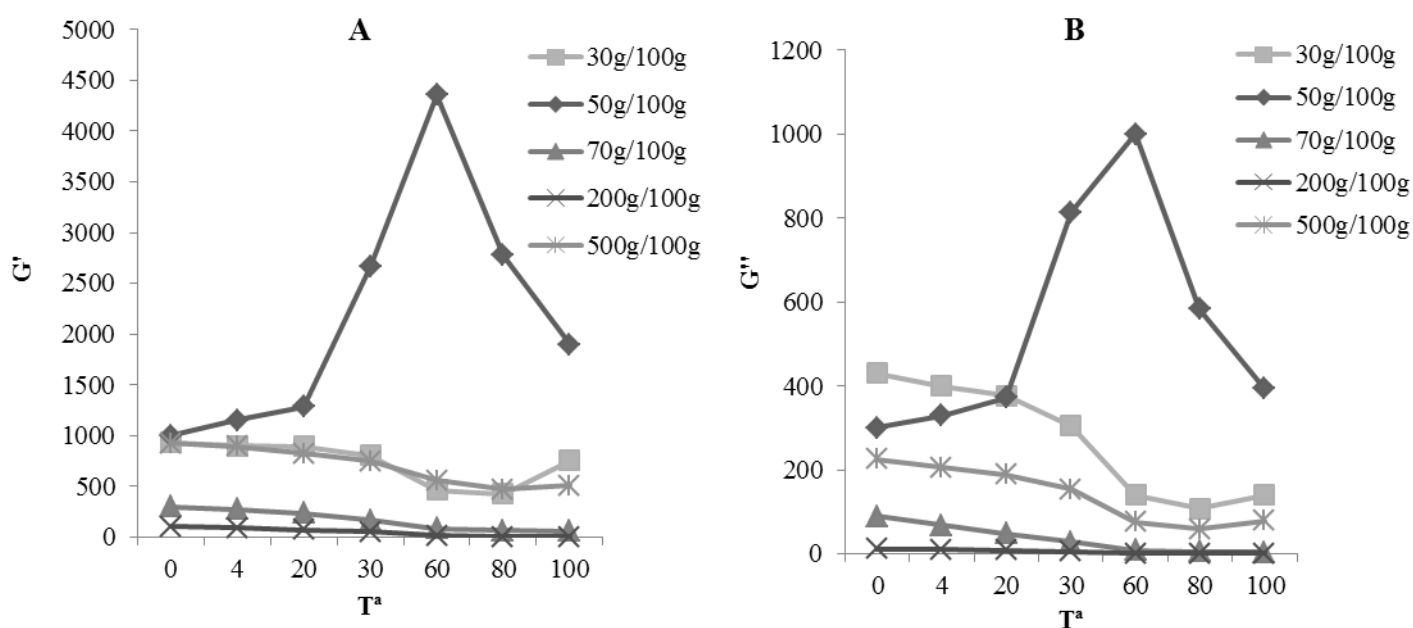


Figura 1. Efecto de diferentes temperaturas sobre los módulos G' y G'' de geles de plasma sintetizados con diferentes concentraciones de glicerol a pH 2. G' (A) y G'' (B).

3.2.2. Curvas de flujo

Las curvas de flujo han sido realizadas en modo CS, a $6\pm 1^\circ$ C y de 0 a 50 Pa de esfuerzo cortante. Los datos obtenidos a partir de las curvas de flujo fueron ajustados a la siguiente ecuación:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

dónde τ es el esfuerzo cortante (Pa), τ_0 es el punto de fluencia (Pa), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (s^{-1}), k es el índice de consistencia ($Pa \cdot s^n$) y n es el índice de comportamiento (adimensional). Los valores de n y k de las muestras analizadas se muestran en la Tabla 2. Todos los datos reflejan una buena correlación con la ecuación (1) (valores de R^2 de 0.99 o mejores).

Tabla 2. Valores del índice de comportamiento (n) y del índice de consistencia (k) de geles de plasma sintetizados con diferentes concentraciones de glicerol a pH 2. Se muestran los valores medios \pm DS (Desviación Standard)

Concentración de glicerol por 100 g de proteínas plasmáticas	n (adimensional)	k ($Pa \cdot s^n$)	Fluido
30 g	6.576e-01 \pm 0.009	3.940e+01 \pm 2	Pseudoplástico
50 g	2.771 \pm 0.04	1.782 \pm 0.5	Dilatante
70 g	7.810e-01 \pm 0.03	1.102e+01 \pm 2	Pseudoplástico
200 g	7.211e-01 \pm 0.002	1.497e+01 \pm 1	Pseudoplástico
500 g	2.680 \pm 0.1	4.392 \pm 0.8	Dilatante

Tal y como indica Steffe (Steffe, 1996), los valores de n y k nos permiten clasificar los diferentes tipos de fluidos. Los geles analizados presentan comportamientos tanto pseudoplásticos como dilatantes. En concreto, los geles sintetizados con una concentración de glicerol de 50 g de glicerol/100 g de proteínas plasmáticas, que son los más resistentes, presentan un comportamiento dilatante lo que supone que su viscosidad aparente aumenta al incrementar el esfuerzo constante.

3.2.3. Ensayos de fluencia y recuperación

Los ensayos de fluencia y recuperación nos permiten comprender la estructura interna de los geles así como las variaciones estructurales derivadas de la introducción de cambios en su

composición. En los análisis de fluencia se aplicó un esfuerzo instantáneo de 40 Pa durante 60 segundos a $20\pm 1^\circ\text{C}$. Los de recuperación, también $20\pm 1^\circ\text{C}$., duraron 180 segundos.

El ajuste de $J = f(t)$ está basado en el modelo de Burger (ecuación 2). Todas las muestras han exhibido una respuesta viscosa. Se trata por tanto de geles poco resistentes a cualquier deformación que les sea aplicada. No obstante, cabe destacar que los geles sintetizados con una concentración de glicerol de 50 g/ 100 g de proteínas plasmáticas son los que han mostrado los mejores resultados, ya que presentaron valores de μ_0 and G_0 más altos que el resto de las muestras analizadas.

Tras 60 segundos de aplicación del estrés, este fue eliminado. Como es lógico no se produjo recuperación elástica en ninguno de los geles desarrollados debido al elevado componente viscoso que presentaron.

Teniendo en cuenta que, en todos los ensayos realizados, los mejores resultados se han obtenido para aquellos geles de plasma sintetizados con una concentración de glicerol de 50 g/ 100 g de proteínas plasmáticas, la restante caracterización únicamente se centrará en estas muestras.

3.3. Medida del tamaño de las partículas

La figura 2 muestra las curvas de distribución del tamaño de las partículas de los geles sintetizados con una concentración de glicerol de 50 g/100 g de proteínas plasmáticas.

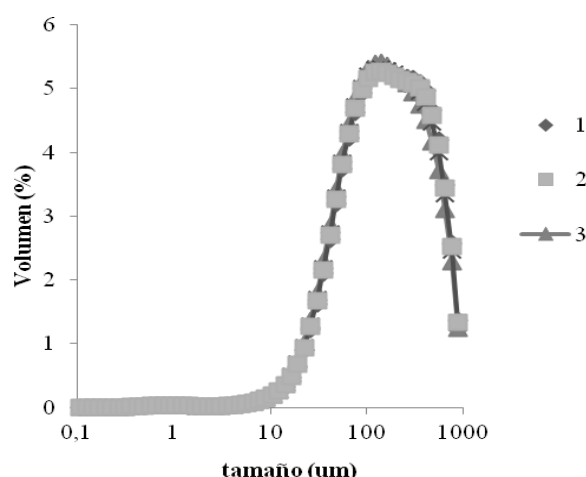


Figura 2. Curvas de distribución de tamaños de las partículas de geles de plasma sintetizados con una concentración de glicerol de 50g /100g de proteína.

La distribución de tamaños de estos geles muestra curvas prácticamente unimodales. En cuanto al diámetro medio de las partículas los resultados obtenidos ofrecen valores de $d_{4,3}$ de 211.51 ± 3 μm . Por otro lado, los cocientes $D_{10/50}$ y $D_{50/90}$, con valores de 0.25 ± 0.02 y 0.29 ± 0.03 respectivamente, nos indican que la mayor parte de las partículas presentan tamaños por encima de $100 \mu\text{m}$ (hecho que puede corroborarse con las imágenes de microscopía electrónica).

3.4. *Microestructura*

La figura 3 muestra la imagen obtenida a través del microscopio electrónico de barrido de un gel de plasma sintetizado con una concentración de glicerol de 50 g/100 g de proteínas plasmáticas. En ella las áreas grises muestran los agregados de proteínas y los espacios negros representan los poros en la red del gel que contienen la fase acuosa (Salvador et al., 2009).

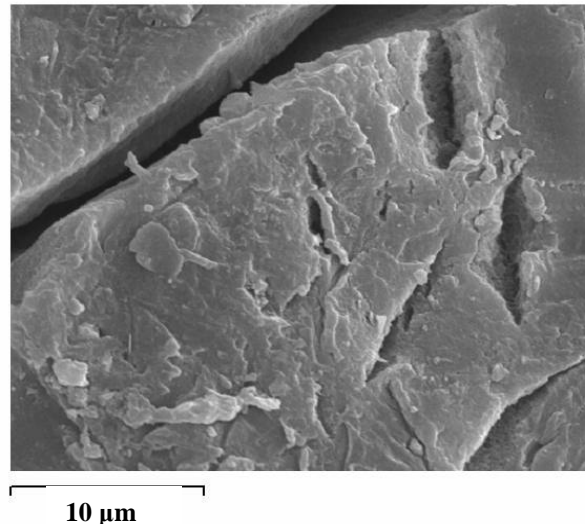


Figure 3. Micrografía electrónica de barrido de un gel de plasma sintetizado con una concentración de glicerol de 50 g/100 g de proteínas plasmáticas a pH 2.

Al observar la micrografía se pueden distinguir grandes agregados proteicos con pequeños espacios entre ellos (sólo los debidos a los cortes producidos al preparar la muestra). Esto puede ser consecuencia del carácter ácido de estos geles, ya que al ser sintetizados a pH 2 pueden haber experimentado una coagulación ácida que conlleve a la formación de una fina red de compactas cadenas sin apenas espacio entre las partículas.

4. Conclusiones

Los resultados muestran que los geles elaborados a pH ácido y sintetizados a una concentración de 50 g de glicerol por 100 g de proteínas plasmáticas son los más resistentes y, por tanto, podría utilizarse como películas para recubrir productos alimenticios. Además para todas las muestras estudiadas el módulo elástico (G') supera al viscoso (G''). Los geles de glicerol presentan comportamientos tanto pseudoplásticos como dilatantes y los análisis de fluencia y recuperación muestran una respuesta viscosa en todos los casos. Las medidas de la distribución del tamaño de las partículas y el estudio de la microestructura muestran unas curvas de distribución de tamaños prácticamente unimodales, presentado la mayoría de las partículas dimensiones por encima de 100 μm . En cuanto a la micrografía electrónica de barrido, se pueden distinguir grandes agregados proteicos con pequeños espacios entre ellos, lo cual podría ser consecuencia la coagulación ácida sufrida por las muestras.

5. Referencias

- Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2007). Heat induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76, 216-225.
- Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78, 522-528.
- Dolz, M., Hernández, M. J. & Delegido, J. (2006). Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22, 421-247.
- Gras, J. (1983). *Plasma proteins*. Barcelona, Spain: Lims.
- Harris, E. R. V. (1989). *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University.
- Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., & Díaz, M. (2009). Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *Journal of Food Engineering*, 97, 243-252.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Nuthong, P., Benjakul S. & Prodpran T. (2009). Effect of some factors and pretreatment on the properties of porcine plasma protein-based films. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 1545-1552.

Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influence by pH. *Journal of Food Science*, 63(6), 958-961.

Saguer, E., Fort, N., Álvares, P. A., Sedman J., & Ismail, A. (2008). Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. *Food Hydrocolloids* 22(3), 459-467.

Salvador, P., Toldrá, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2009). Microstructure- function relationships of heat induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1654-1659.

Silva, V., & Silvestre, M. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36(7), 709-718.

Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. USA: FreemanPress.

Oshodi, A. & Ojokan, E. (1997). Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry* 59, 333-338.

Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa- Cánovas, G.V., (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 147-156.

6.2. Geles sintetizados a partir de las fracciones del plasma

Este apartado incluye tres artículos en los que se muestra el análisis de geles sintetizados a partir de soluciones de cada una de las fracciones proteicas del plasma (fibrinógeno, γ -globulinas, α y β globulinas y albúminas).

En todos estos artículos se realiza una caracterización reológica de los nuevos productos y se lleva a cabo un estudio de sus propiedades térmicas, análisis de la distribución granulométrica de sus partículas, microestructura y capacidad de retención de agua. Así mismo, en algunos casos se evalúa si el proceso de liofización afecta a las características reológicas de las muestras.

Caracterización reológica de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas de plasma porcino

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz *

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Oviedo, Facultad de Química, C/Julián Clavería s/n, 33071 Oviedo, España

*Autor correspondiente. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.

Dirección de correo electrónico: mariodiaz@uniovi.es (M. Díaz)

Resumen

El plasma porcino es un subproducto de la industria cárnica con multitud de usos potenciales. Está compuesto por una mezcla de proteínas, por tanto, el aislamiento de sus diferentes fracciones proteicas puede tener múltiples aplicaciones. En el presente trabajo se ha analizado la capacidad gelificante de las fracciones 1 y 2 del plasma, obtenidas por el método de fraccionamiento de Cohn. Estas fracciones están constituidas por fibrinógeno y γ -globulinas respectivamente, y presentan unas propiedades gelificantes que podrían ser aprovechadas para sintetizar películas que permitan proteger productos alimenticios. El objetivo pasa por desarrollar películas útiles, con una buena resistencia, elasticidad y capacidad de retención de agua. Para ello, se han preparado geles de ambas fracciones bajo diferentes condiciones (a pH 2, 7 y 10) y se han evaluado las características reológicas de las mismas. También se han analizado los tamaños de las partículas que componen estos geles, su comportamiento térmico, su microestructura y su capacidad de retención de agua. Los resultados obtenidos muestran que sólo alguna de las soluciones experimentó un proceso de gelificación. Ninguna de las muestras a pH 2 logró gelificarse y las proteínas liofilizadas fueron las que produjeron los geles más resistentes. Para todas las muestras estudiadas el módulo elástico (G') superó al viscoso (G'') y, en general, el punto de gelificación se incrementó al aumentar el pH. Los geles analizados presentaron comportamientos tanto pseudoplásticos como dilatantes y, en general, mostraron una respuesta visco-elástica. Los análisis de calorimetría diferencial de barrido corroboraron los resultados obtenidos a partir de las determinaciones reológicas y las medidas de la distribución del tamaño de las partículas exhibieron curvas bimodales, en el caso de los geles de fibrinógeno, y unimodales, en los geles de γ -globulinas.

Palabras clave: gel, plasma, fibrinógeno, γ -globulinas, reología.

1. Introducción

El plasma sanguíneo es altamente valorado en la industria alimenticia gracias a sus excelentes propiedades funcionales (Del Hoyo et al., 2007). La capacidad gelificante es una de las propiedades más estudiadas ya que permite optimizar multitud de preparados alimenticios e incluso podría ser usada para desarrollar nuevos productos para proteger alimentos. Existe una amplia bibliografía sobre las propiedades gelificantes de las proteínas plasmáticas (Parés et al., 1998; Dávila et al., 2007; Saguer et al., 2008, Nuthong et al., 2009). Sin embargo, apenas se han llevado a cabo estudios reológicos exhaustivos de geles sintetizados a partir de las fracciones aisladas del plasma. La capacidad gelificante que el plasma presenta se debe a la suma de las propiedades de sus constituyentes individuales, la interacción entre ellos e incluso las condiciones del medio en que se encuentran. La formación de geles ocurre cuando moléculas desnaturalizadas se agregan para formar una red proteica organizada. Ello se consigue, en muchos casos, mediante un tratamiento térmico. Las propiedades de los geles están influenciadas por factores como el pH, la concentración proteica o los pretratamientos a los que se hayan sometido las proteínas (Silva & Silvestre, 2003).

Para llevar a cabo la separación de las proteínas sanguíneas ha sido necesario separar la fracción líquida, el plasma de la fracción celular (Harris, 1989). El plasma está básicamente compuesto de proteínas (7%), agua (91%) y una variedad de sales minerales y componentes de bajo peso molecular (1%) (Del Hoyo et al., 2007). La mayor parte de las proteínas sanguíneas se encuentran en el plasma, excepto al hemoglobina, que es la proteína más abundante de la fracción celular (Gras, 1983). El plasma sanguíneo está formado por cuatro fracciones proteicas, según el método de Cohn. La fracción 1 (F1) está representada por el fibrinógeno, la fracción 2 (F2) está constituida principalmente por γ -globulinas, la fracción 3 (F3) sobre todo por α and β -globulinas y la fracción 4 (F4) por albúmina. En este trabajo se han sintetizado geles de fibrinógeno y γ -globulinas bajo diferentes condiciones de pH. Se ha modificado el pH ya que se ha pretendido simular la acidez de productos como los limones, ciruelas o algunas mermeladas (que presentan un pH alrededor de 2), la neutralidad de la carne de cerdo, pollo o pescado fresco (pH sobre 7) o la basicidad de los huevos blancos (pH en torno a 10) y por tanto el efecto que tendría el pH al formarse los geles.

La reología es necesaria para caracterizar estos nuevos geles ya que la estabilidad reológica es considerada un importante parámetro de calidad (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas, 2005). Se han llevado a cabo diferentes análisis reológicos que nos han aportado una valiosa

información. Tal es el caso de los barridos de temperatura, que nos muestran a qué temperatura las soluciones de fracciones proteicas experimentan una transición del estado líquido al gel, los ensayos de fluencia y recuperación que nos permiten entender la estructura interna de los geles y las variaciones estructurales asociadas a la introducción de cambios en su composición (Dolz et al., 2006), las curvas de flujo que nos muestran el comportamiento de las muestras o el efecto que la temperatura ejerce sobre los módulos elástico y viscoso de los geles. Para completar la caracterización se ha analizado el comportamiento térmico de los geles a través de técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC), su microestructura por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM) y medida del tamaño de las partículas y su capacidad de retención de agua.

El objetivo de este trabajo ha sido la caracterización reológica de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas. Para ello se han llevado a cabo diferentes ensayos reológicos tales como barridos de temperatura, curvas de flujo, ensayos de fluencia y recuperación o análisis del efecto de la temperatura. Además, se han empleado técnicas de calorimetría diferencial de barrido, medida del tamaño de las partículas, microscopía electrónica de barrido y capacidad de retención de agua.

2. Materiales y métodos

2.1. Plasma

La sangre empleada en este trabajo ha sido de procedencia porcina proveniente del Matadero Central de Asturias Junquera-Bobes (Noreña). La sangre se recogió en un recipiente al que rápidamente se añadió el anticoagulante citrato de sodio (Panreac) en una concentración 1% v/v. Ya en el laboratorio la sangre fue centrifugada a 10000xg durante 10 minutos para separar el plasma (60% del volumen total) de la fracción celular (40%). Para ello se utilizó una centrífuga Kubota 6700 y se emplearon tubos de 250 mL. El plasma obtenido por este procedimiento fue mantenido a 4 °C.

2.2. Fraccionamiento del plasma

La separación de las diferentes fracciones del plasma ha sido llevada a cabo siguiendo una modificación de la técnica de Cohn (Moure, 2000). En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo del proceso. Las muestras fueron mantenidas a 0°C durante todo el proceso y el etanol fue añadido gota a gota y agitando constantemente para evitar la precipitación de las proteínas pertenecientes a otras fracciones.

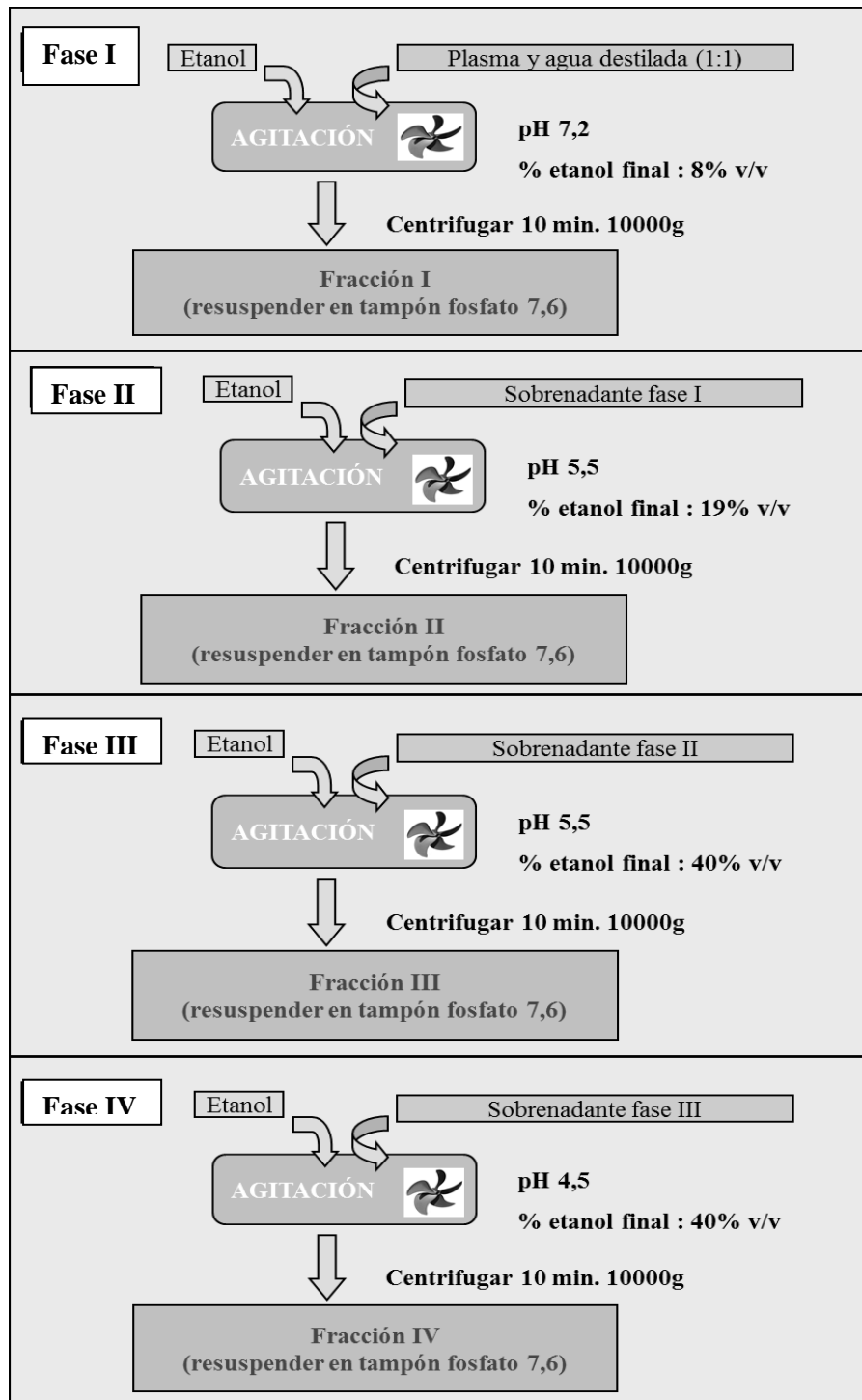


Fig. 1. Diagrama de flujo del fraccionamiento de las proteínas plasmáticas.

Se cuantificó el contenido proteico y la cantidad de sólidos totales de cada una de las fracciones obtenidas por este procedimiento. Para ello las cuatro fracciones fueron redisueltas en un volumen de buffer similar al de plasma de partida. Adicionalmente, una parte de cada fracción fue liofilizada a -70°C y 0.1mba en un liofilizador Telstar Cryodos. Las muestras fueron congeladas a -80°C antes de ser liofilizadas. El extracto seco de las muestras sometidas a este procedimiento fue aproximadamente del 96% (p/p).

2.3. Determinación de las proteínas de cada fracción

Con el objetivo de identificar cada una de las proteínas presentes en cada fracción se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las muestras fueron diluidas 1:25 (v/v) en un tampón de disociación compuesto por 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.05% (p/v) de azul de bromofenol, 35% (p/v) de glicerol, 5% (v/v) β -mercaptoetanol, 8% (p/v) solución SDS y calentadas en agua hirviendo durante 5 minutos. Las muestras se colocan en un gel de poliacrilamida (gel de concentración 3.5% y gel de separación 12%) con un tampón de migración compuesto por 0.02M Tris (hydroximetil) aminometano, glicina 5M, solución SDS (p/v) 0.1%. La solución de tñido estaba compuesta por: 0.1% (p/v) azul de Coomaise, 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético y 40% (v/v) de agua destilada. La composición de la disolución de desteñido fue: 10% (v/v) de ácido acético, 40% (v/v) de metanol y 50% (v/v) de agua destilada. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Se utilizaron proteínas de alto peso molecular (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range) (Bio-Rad) como patrones.

2.4. Preparación de los geles de las fracciones 1 (fibrinógeno) y 2 (γ -globulinas)

Las soluciones frescas y liofilizadas fueron redisueltas en agua destilada hasta conseguir una concentración de proteína del 10% (p/p) y fueron ajustadas a pH 2, 7 y 10 con HCl 0.5M o NaOH 0.5M. A continuación, fueron colocadas en placas de cristal de 80 mm de diámetro (TDS Pierron) añadiendo aproximadamente 3 g de solución en cada una y fueron calentadas a $85\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 45 min en un incubador (J.P. Selecta 2000209). Una vez producida la gelificación las muestras fueron inmediatamente enfriadas a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 min, y después fueron almacenadas a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas antes de ser analizadas.

2.5. Caracterización de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas

Se han llevado a cabo diferentes análisis físicos y químicos que nos han permitido caracterizar los geles de las fracciones 1 y 2.

2.5.1. Determinaciones reológicas

Los análisis reológicos han sido llevados a cabo utilizando un reómetro rotacional (Haake MARS II) con un sistema Peltier para control de la temperatura. Antes de comenzar cada medida las muestras se han dejado estabilizar al menos 15 min., contrarrestando así el estrés inducido durante la carga de las mismas (Laca et al., 2009), y para evitar la desecación durante los análisis se han empleado aceite de silicona y cubiertas de cristal. Las muestras se han analizado por triplicado.

En estado estacionario, las curvas de flujo se han llevado a cabo en modo de estrés controlado CS (Controlled Stress) a $6\pm 1^\circ\text{C}$ de 0 a 50 Pa de esfuerzo cortante. Estos análisis nos permiten clasificar los diferentes tipos de fluidos. La ley de Herschel- Bulkley (Steffe, 1996) puede considerarse como un modelo para describir el comportamiento de los fluidos no Newtonianos:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad \text{Ley de Herschel-Bulkley (1)}$$

dónde τ es el esfuerzo cortante (Pa), τ_0 es el punto de fluencia (Pa), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (s^{-1}), k es el coeficiente de consistencia ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$) y n es el índice de comportamiento (adimensional). Esta ecuación es muy conveniente ya que los fluidos Newtonianos, los pseudoplásticos (cuando $0 < n < 1$), los dilatantes ($1 < n < \infty$) y los plásticos de Bingham pueden considerarse casos especiales del modelo de Herschel-Bulkley (como puede observarse en la Tabla 1).

Tabla 1. Fluidos Newtoniano, dilatante, pseudoplástico y plástico Bingham como casos especiales del modelo Herschel-Bulkley (Steffe, 1996)

Fluido	k	n	τ_0
Herschel-Bulkley	>0	$0 < n < \infty$	> 0
Newtoniano	>0	1	0
Pseudoplástico	>0	$0 < n < 1$	0
Dilatante	>0	$1 < n < \infty$	0
Plástico-Bingham	>0	1	> 0

En condiciones transitorias, los ensayos de fluencia y recuperación nos permiten comprender la estructura interna de los geles. En los análisis de fluencia se aplicó a la muestra un esfuerzo instantáneo de 40 Pa durante 60 segundos a $20\pm 1^\circ\text{C}$. Los de recuperación, también a $20\pm 1^\circ\text{C}$., duraron 180 segundos. Uno de los modelos que mejor refleja la deformación de un sistema es el modelo de Burger de cuatro componentes, ya que representa la asociación del comportamiento puramente elástico o puramente viscoso en series (modelo de Maxwell) o en paralelo (modelo Kelvin-Voigt). En el modelo de Burger, el sistema de deformación llamado complianza, J , corresponde a la siguiente ecuación (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (2)$$

dónde J_0 es la complianza instantánea, J_1 es la complianza retardada, λ_{ret} es el tiempo de retardo (tiempo para alcanzar la máxima deformación) y μ_0 es la viscosidad Newtoniana del amortiguador libre. La suma de J_0 y J_1 es llamada complianza en estado estacionario (J_{0e}) y λ_{ret} representa el cociente $\frac{\mu_0}{G_0}$, dónde G_0 es el módulo instantáneo elástico de la unidad Maxwell. Obteniendo los valores de J_{0e} , μ_0 , G_0 y λ_{ret} podemos comparar la estructura de los geles, ya que nos proporciona un modelo mecánico responsable de la deformación.

En condiciones dinámicas se ha estudiado el efecto de diferentes temperaturas sobre los geles ya formados. En concreto se han ensayado temperaturas desde 0 a 100°C , con una tasa de calentamiento de $0.6^\circ\text{C}/\text{min}$. Estos análisis se han llevado a cabo en modo CS a un constante esfuerzo cortante de 10 Pa.

2.5.2. Análisis químicos

Los siguientes parámetros han sido analizados y determinados en cada muestra por triplicado: pH, usando un pHmetro Crison micropH 2001; humedad con el analizador Halógeno de Humedad HR73; concentración proteica a través del método de Lowry (Lowry et al., 1951); y absorbancia usando un espectrofotómetro Shimadzu UV 1203 UV-Vis a 500 nm.

2.5.3. Determinación del tamaño de las partículas

Los geles fueron analizados por un analizador del tamaño de las partículas (Malvern Mastersizer) siguiendo el procedimiento descrito por Worrasinchai y colaboradores (2006). La medida del tamaño de las partículas se presenta como el diámetro de volumen medio ponderado: $d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$, dónde n_i es el número de partículas de diámetro d_i . Además hay dos parámetros

que nos permiten determinar el grado de dispersión de tamaños de partículas: D10/D50 y D50/D90. La distribución es monodispersa cuando el cociente entre estos índices es igual a la unidad, por el contrario un sistema puede ser muy polidisperso cuando las relaciones entre ellos tienden a ser pequeñas. Las muestras se almacenaron a temperatura de refrigeración (4 °C). Se analizaron dos muestras diferentes de cada gel y cada muestra se midió por triplicado.

2.5.4. *Microscopía electrónica de barrido*

Se caracterizaron secciones transversales de los geles por microscopía electrónica de barrido. Todas las muestras, de aproximadamente 0.5g., fueron sometidas a fijación química en tampón fosfato 0.025M (pH 6.8, Panreac) con el 3% de glutaraldehído (v/v, Panreac). Tras una hora las muestras fueron lavadas nuevamente dos veces en el mismo tampón fosfato durante 15 min. A continuación las muestras fueron deshidratadas sumergiéndolas durante 15 minutos en disoluciones acuosas con una concentración creciente de etanol al 96% (Panreac) (20, 40, 60, 80 y 100 (dos veces) % v/v etanol en agua). Una vez en etanol absoluto, las muestras se transfirieron al 100% de acetona (Panreac) de modo similar, sumergiéndolas durante 10 minutos en disoluciones de etanol con una concentración creciente de acetona (30, 50, 70, 90 y 100 (dos veces) % v/v acetona en etanol). Posteriormente las muestras fueron desecadas por punto crítico con CO₂ (Critical Point Dryer Balzers CPD 030, Polaron). Una vez secas las muestras se montaron sobre soportes de aluminio con cinta de carbón adhesiva de doble cara y se bombardearon con oro en un evaporador al vacío (Balzers SCD004, BAL-TEC AG). Finalmente las muestras fueron visualizadas en el microscopio electrónico de barrido JEOL Deba -6100 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan).

2.5.5. *Capacidad de retención de agua*

La capacidad de retención de agua (CRA) fue determinada de acuerdo a los métodos basados en la centrifugación (Kneifel et al., 1991). Una cantidad de muestra de 1 g se centrifugó a temperatura ambiente (20 °C), 20000xg durante 5 min (Centrifuga Eppendorf 5415R) y se pesó la cantidad de agua liberada. La capacidad de retención de agua fue expresada de acuerdo al porcentaje de pérdida de agua, según la ecuación descrita por Chantrapornchai and McClements (2002):

$$\% \text{ de pérdida} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

dónde m_i es la masa inicial de la muestra m_f es la masa después de la centrifugación.

3. Resultados y discusión

3.1. Fraccionamiento del plasma

Se obtuvieron las cuatro fracciones del plasma por el procedimiento químico de fraccionamiento mediante la adición de etanol referido en el apartado de metodología. En la Tabla 2 se muestra la cantidad de proteína y el contenido de sólidos totales de cada fracción.

Tabla 2. Contenido proteico y de sólidos totales de las cuatro fracciones plasmáticas

	Plasma	Fracción 1	Fracción 2	Fracción 3	Fracción 4
Contenido proteico (%)	7.35	0.18	2.8	1.6	2.6
Sólidos totales (%)	8	0.20	3.1	1.8	2.7

La fracción 1 presentó la cantidad más baja de proteína y las fracciones 2 y 3 juntas representaron más del 60% de dicha cantidad. Del análisis de la Tabla 2 también se desprende que el contenido proteico supone más del 95% de los sólidos totales de cada fracción, lo cual es debido a que la grasa (que contribuye al contenido total de sólidos) es eliminada por completo en el proceso de centrifugación y a que no existe ningún aporte de sales en el proceso de precipitación.

3.2. Determinación de las proteínas de cada fracción

Tal y como se ha indicado antes, se realizó una electroforesis para identificar las proteínas de cada una de las fracciones del plasma. En la figura 2 se muestran las bandas de electroforesis. En primer lugar se representa la banda de referencia, mostrándose a continuación las cuatro fracciones proteicas. La calle 1 está representada por fibrinógeno (fracción 1, F1), la 2 por varias proteínas, con la mayoría de γ -globulinas (F2). La calle 3 es bastante similar a la 2, pero en este caso las proteínas mayoritarias son las α y β -globulinas (F4), finalmente la calle 4 está representada por albúminas (F4).

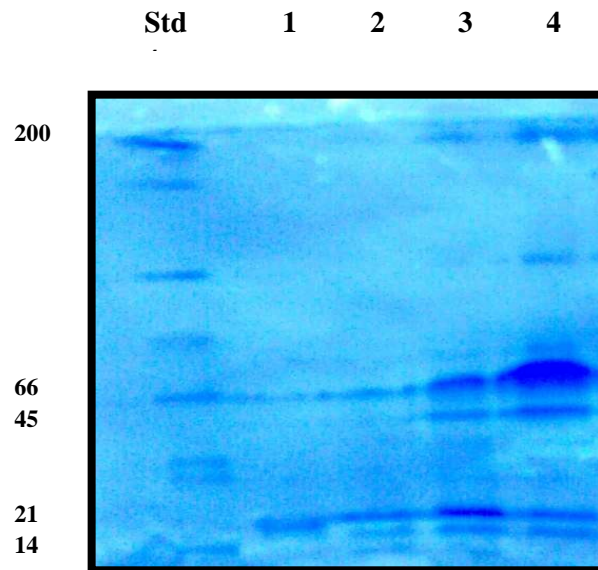


Fig. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las diferentes fracciones plasmáticas. Calle 1: Fracción 1 (Fibrinogeno); calle 2: Fracción 2 (γ -globulinas); calle 3: Fracción 3 (α and β -globulinas); calle 4: Fracción 4 (seroalbuminas).

3.3. Caracterización de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas

La caracterización de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas, frescos y liofilizados, bajo distintas condiciones de pH fue necesaria para estudiar sus aplicaciones potenciales.

3.3.1. Medidas reológicas

La estabilidad reológica es un importante parámetro de calidad. Por lo tanto, se han ensayado diferentes análisis reológicos que nos han permitido comprender la naturaleza de estas nuevas películas para proteger alimentos.

A. Barridos de temperatura

Para llevar a cabo este análisis la temperatura se incrementó desde 20 a 110 °C (con una velocidad de calentamiento de 0.6 °C/min), tras lo cual se enfrió hasta 20 °C (0.6 °C/min). Durante la gelificación, las disoluciones de fracciones experimentaron una fase de transición de líquido a gel que constituye un punto crítico en el que las variaciones en dicha transición podrían ser debidas a los pretamientos a los que han sido sometidas.

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos de los barridos de temperaturas de los geles sintetizados con fibrinógeno. Los módulos G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) fueron determinados en función de la temperatura a una frecuencia dada.

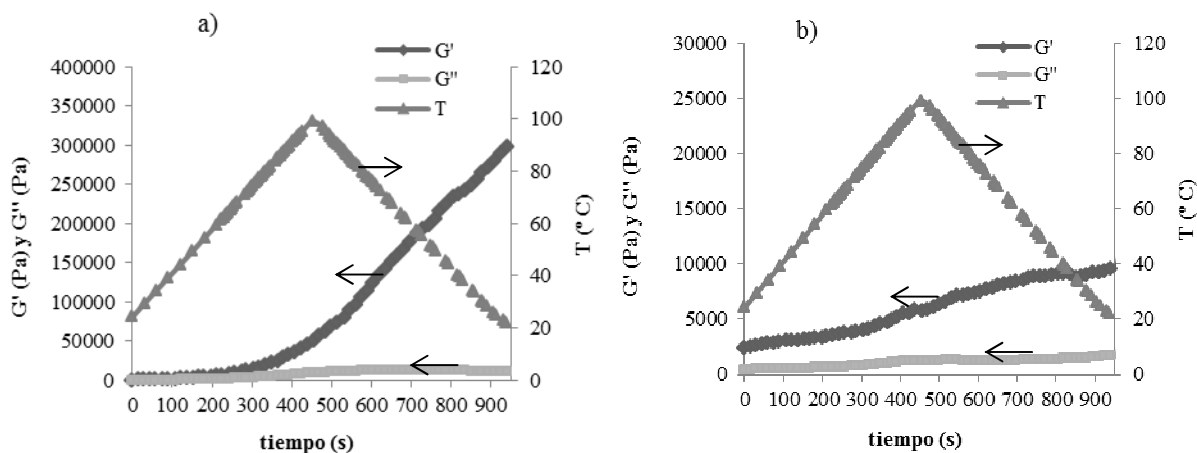


Fig. 3. Barridos de temperatura de las soluciones de fibrinógeno liofilizadas a pH 7 (a) y 10 (b).

Como puede comprobarse sólo las disoluciones de fibrinógeno liofilizadas a pH 7 y 10 sometidas a un tratamiento térmico inducido experimentaron un proceso de gelificación. En concreto, las geles sintetizados a pH neutro resultaron los más resistentes, con valores de G' de hasta 300.000 Pa.

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos de los barridos de temperaturas de los geles sintetizados con γ -globulinas. Del mismo modo, los módulos G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) fueron determinados en función de la temperatura a una frecuencia dada.

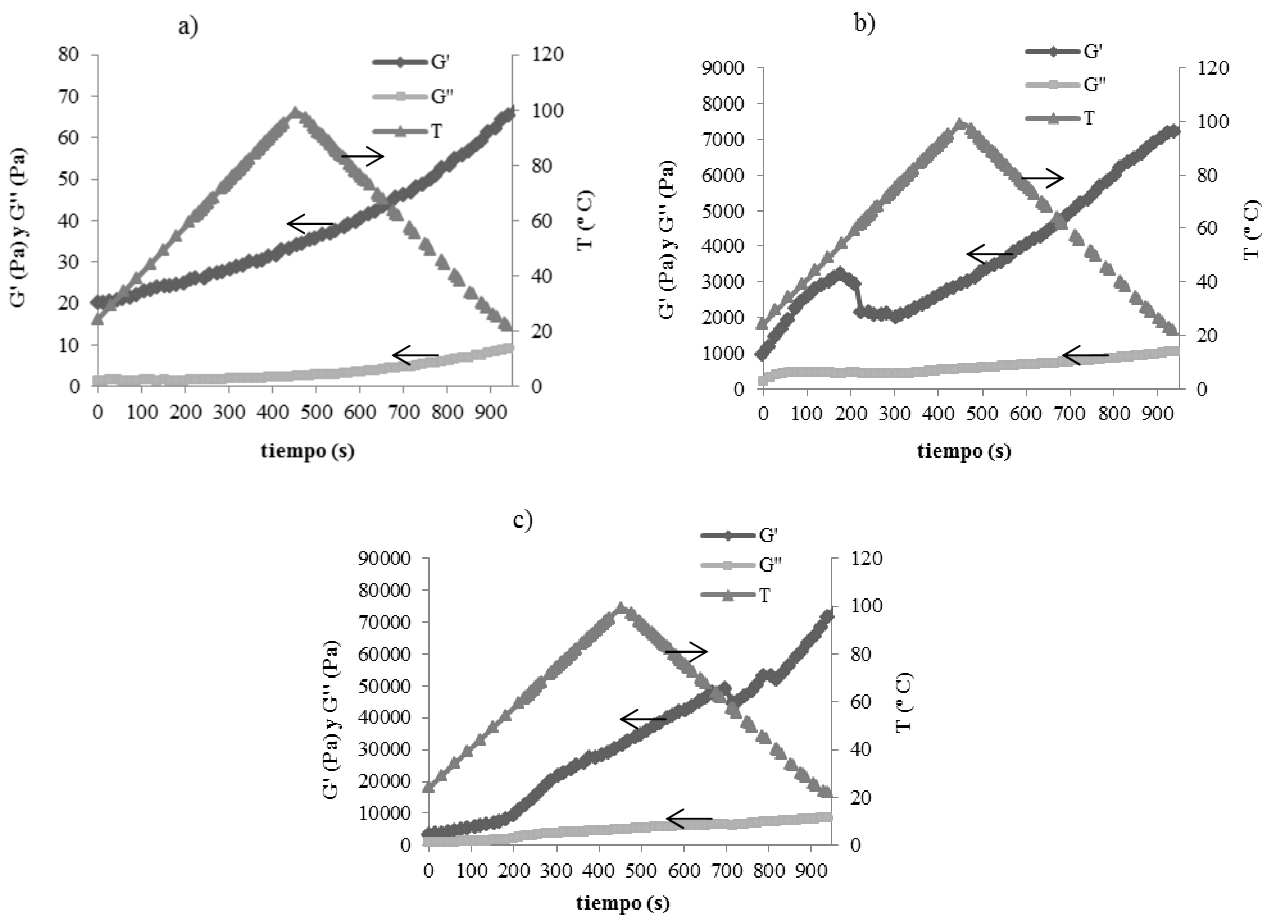


Fig. 4. Barridos de temperatura de las soluciones de γ -globulinas frescas a pH 7 (a), liofilizadas a pH 7 (b) y liofilizadas a pH 10 (c).

Las disoluciones de γ -globulinas frescas a pH 7 y las liofilizadas a pH 7 y 10 formaron geles. Las muestras liofilizadas son las que han producido los geles más resistentes, obteniéndose mejores resultados para los geles liofilizados a pH 10 que para los geles liofilizados a pH neutro.

Comparando ambas fracciones se puede comprobar que ninguna de las muestras a pH 2 logró gelificarse, lo cual puede ser explicado como consecuencia de la repulsión que las cargas eléctricas de las proteínas experimentan a pH ácido. Las muestras de geles realizados con proteínas liofilizadas son las que produjeron los geles más resistentes, de hecho solamente a uno de los pH las muestras frescas ha producido un gel (que han resultado los menos resistentes de todos los formados).

Durante el calentamiento los módulos elástico (G') y viscoso (G'') fueron prácticamente constantes hasta que alcanzaron una determinada temperatura en la que rápidamente se incrementaron. Esta temperatura, que nos indica la transición de un estado líquido (sol) a un estado gelatinoso (gel), generalmente es considerada el punto de gelificación en ausencia del cruce entre G' y G'' (Lamsal et al., 2007). En este trabajo los puntos de gel fueron determinados de este modo, mostrándose los resultados en la Tabla 3.

Tabla 3. Puntos de gelificación de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas obtenidos a partir de los barridos de temperatura

Geles	Sintetizados con soluciones	pH	Punto de Gel ($^{\circ}\text{C}$)
F1	Liofilizadas	7	83.05 \pm 1.2
	Liofilizadas	10	85.31 \pm 1.1
F2	Frescas	7	81.12 \pm 0.9
	Liofilizadas	7	72.92 \pm 0.7
	Liofilizadas	10	73.92 \pm 0.7

Para los geles sintetizados con soluciones de fibrinógeno el punto de gelificación se incrementó al aumentar el pH. Este comportamiento ha sido descrito como consecuencia de la repulsión de la carga neta (Murata et al., 1993) y la formación de estructuras en hoja β a diferentes temperaturas (Wang & Damodaran, 1991; Yasuda et al., 1986), y constituye un claro beneficio a nivel industrial ya que es necesario un menor gasto energético para lograr la gelificación.

En los geles elaborados con soluciones de γ -globulinas liofilizadas también se observó un incremento del punto de gelificación al aumentar el pH, siendo inferior este valor al alcanzado por los geles sintetizados a partir de soluciones frescas.

Una vez formados los geles, se ha analizado el efecto de diferentes temperaturas (desde 0 a 100 $^{\circ}\text{C}$, a una tasa de calentamiento de 0.6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) en los módulos elástico y viscoso. Estas temperaturas han sido escogidas para simular diferentes situaciones a las que podrían estar sometidos estos geles al cubrir alimentos. Entre ellas podemos encontrarnos con temperaturas de refrigeración, temperatura ambiente a altas temperaturas que podrían alcanzarse al proteger productos alimenticios tratados térmicamente. Los resultados se muestran en la Figura 5, dónde se puede observar G' (módulo elástico) y G'' (módulo viscoso) determinados en función de la

temperatura a una frecuencia fija. Tanto para los geles elaborados a partir de soluciones de fibrinógeno (F1) como para los elaborados a partir de soluciones de γ -globulinas (F2), el módulo elástico supera al viscoso y, en general, se observa un descenso en G' y G'' al incrementarse la temperatura. De hecho, la única excepción a esto último la constituyen los geles sintetizados con soluciones de γ -globulinas frescas a pH neutro, que como ya se ha indicado anteriormente resultaron los geles menos resistentes. El resto de geles, tanto los sintetizados a partir de soluciones de la F1 como de la F2, que han sido desarrollados a partir de soluciones liofilizadas, presentan los mayores valores de G' y G'' entre 0 y 4°C. Esto los convierte en sumamente adecuados para proteger productos alimenticios a temperaturas de refrigeración.

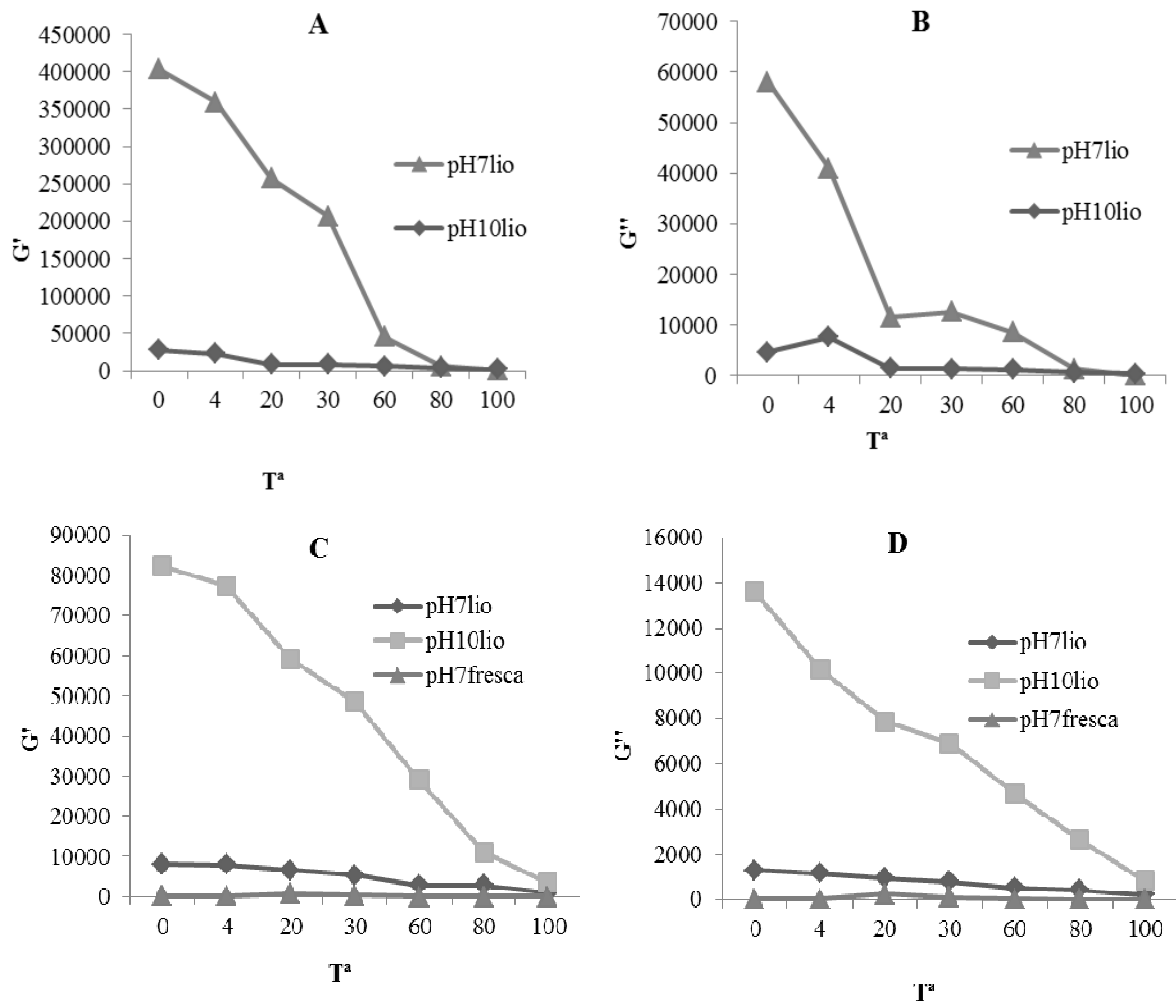


Fig. 5. Efecto de diferentes temperaturas sobre los módulos G' y G'' de geles de fibrinógeno y γ -globulinas. G' de geles de la F1 (A), G'' de geles de la F1 (B), G' de geles de la F2 (C) y G'' de geles de la F2 (D).

B. Curvas de flujo

Las curvas de flujo han sido realizadas en modo CS, a $6\pm 1^\circ\text{C}$ y de 0 a 50 Pa de esfuerzo cortante. Los datos obtenidos a partir de las curvas de flujo fueron ajustados a la siguiente ecuación:

$$\tau = \tau_0 + k\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

dónde τ es el esfuerzo cortante (Pa), τ_0 es el punto de fluencia (Pa), $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación (s^{-1}), k es el índice de consistencia ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$) y n es el índice de comportamiento (adimensional). Los valores de n y k de las muestras analizadas se muestran en la Tabla 4. Todos los datos reflejan una buena correlación con la ecuación (1) (valores de R^2 de 0.99 o mejores).

Tabla 4. Valores del índice de comportamiento (n) y del índice de consistencia (k) de geles de fibrinógeno (F1) y γ -globulinas (F2). Se muestran los valores medios \pm DS (Desviación Standard)

Geles	Sintetizados con soluciones	pH	n (adimensional)	k ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)	Fluido
F1	Liofilizadas	7	1.393e-01 \pm 0.007	1.263e+03 \pm 9	Pseudoplástico
	Liofilizadas	10	1.557 \pm 0.03	1.061e+09 \pm 88	Dilatante
F2	Frescas	7	1.059 \pm 0.02	1.215e+01 \pm 2	Dilatante
	Liofilizadas	7	5.604e-02 \pm 0.002	1.662e \pm 0.03	Pseudoplástico
	Liofilizadas	10	4.336 \pm 0.2	8.850e+24 \pm 198	Dilatante

Tal y como indica Steffe (Steffe, 1996), los valores de n y k nos permiten clasificar los diferentes tipos de fluidos.

Como se puede comprobar tanto los geles sintetizados a partir de soluciones de la F1 como los sintetizados a partir de soluciones de la F2 liofilizadas presentan un comportamiento pseudoplástico a pH neutro y dilatante a pH 10. Por el contrario, los geles elaborados a partir de soluciones de la F2 frescas a pH neutro lo presentan dilatante, lo que supone que se su viscosidad aparente aumenta al incrementar el esfuerzo cortante.

C. Ensayos de fluencia y recuperación

Los ensayos de fluencia y recuperación nos permiten comprender la estructura interna de los geles así como las variaciones estructurales derivadas de la introducción de cambios en su composición. En los análisis de fluencia se aplicó un esfuerzo instantáneo de 40 Pa durante 60 segundos a $20\pm 1^\circ\text{C}$. Los de recuperación, también $20\pm 1^\circ\text{C}$., duraron 180 segundos.

El ajuste de $J = f(t)$ está basado en el modelo de Burger (2), obteniéndose medidas de $r^2 \geq 0.99$ en todos los casos. En la Tabla 5 se muestran los valores de J_{0E} , μ_0 , G_0 y λ_{ret} .

Tabla 5. Valores de los parámetros del modelo de Burger de geles de fibrinógeno (F1) y γ -globulinas (F2)

Geles	Sintetizados con soluciones	pH	J_{0E} (1/Pa)	μ_0 (Pa)	G_0 (Pa)	λ_{ret} (s)	r^2
F1	Liofilizadas	7	2.684e-02±0.003	2.630e+03±9	3.722e+01±0.9	70.65±1	0.994
	Liofilizadas	10	5.239e-05±0.00001	1.376e+06±158	1.909e+04±9	72.10±2	0.999
F2	Frescas	7	1.146e-01±0.001	1.763e+04±18	8.727±0.01	20.20e+02±12	0.997
	Liofilizadas	7	2.447e-02±0.001	1.847e+04±21	4.086e+01±0.2	45.21e+01±25	0.998
	Liofilizadas	10	2.022e-05±0.00002	4.101e+01±0.2	1.945e+01±0.1	24.93±2	0.998

En general tanto los geles elaborados a partir de soluciones de fibrinógeno como de γ - globulinas muestran una respuesta visco-elástica ya que presentan un comportamiento no lineal ante la deformación. Además debido a su habilidad para recuperar algo de estructura en forma de energía de almacenamiento, exhiben una deformación permanente algo menor que la deformación total que les ha sido aplicada (Steffe, 1996). La excepción a este comportamiento la constituyen los geles de la F2 sintetizados a partir de soluciones liofilizadas a pH 10, ya que mostraron una respuesta viscosa.

Los geles de la F1 sintetizados a partir de soluciones liofilizadas a pH básico y los geles de la F2 sintetizados a partir de soluciones liofilizadas a pH neutro son los que han presentado una mayor oposición a la deformación. En estos geles los valores de los parámetros μ_0 and G_0 son superiores al del resto de los geles estudiados. Por otra parte los geles la F2 sintetizados a partir de soluciones frescas son los que han mostrado los peores resultados, lo cual nos lleva a pensar que el proceso de liofilización resulta altamente favorable al desarrollo de geles resistentes y elásticos.

Tras 60 segundos de aplicación del estrés el sistema alcanzó la máxima deformación para ese periodo de tiempo, y entonces fue eliminado. Esto ha permitido calcular el porcentaje de recuperación elástico, tal y como se muestra en la Tabla 6.

Table 6. Porcentaje de recuperación elástico de geles de las fracciones plasmática 1 y 2

Geles	Sintetizados con soluciones	pH	% Elastic recovery
F1	Liofilizadas	7	35.61±1.1
	Liofilizadas	10	72.13±1.3
F2	Frescas	7	12.71±0.5
	Liofilizadas	7	93.84±0.7
	Liofilizadas	10	-

Para los geles elaborados a partir de soluciones de la F1 liofilizadas los mejores resultados se observan a pH 10, mientras que para los geles elaborados a partir de soluciones liofilizadas de la F2 se observan a pH neutro. Por tanto, en términos generales los mejores resultados han sido obtenidos para geles sintetizados a pH neutro a partir de soluciones liofilizadas, ya que a pH más altos se han obtenido buenos porcentajes de recuperación en el caso de geles de la F1, pero se han observado respuestas totalmente viscosas en los geles de la F2.

En definitiva, los geles sintetizados a partir de soluciones liofilizadas de fibrinógeno y γ -globulinas a pH neutro son los que han exhibido mejores resultados, ya que se trata de geles resistentes, con puntos de gelificación más bajos que los de geles a otros pH y con buenos resultados de fluencia y recuperación. Por tanto, la restante caracterización únicamente se centrará en estas muestras.

3.3.2. *Propiedades térmicas*

La calorimetría diferencial de barrido (DSC: Differential Scanning Calorimetry) es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de las transiciones térmicas de proteínas alimenticias, ya que proporciona información sobre la conversión de las mismas desde el estado nativo al desnaturalizado. Esto es posible debido a que esta conversión viene acompañada de un incremento de la temperatura, lo que lleva a la formación de un pico endotérmico en el

termograma (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004). En la Figura 6 se muestran los termogramas de las fracciones 1 y 2 a pH neutro.

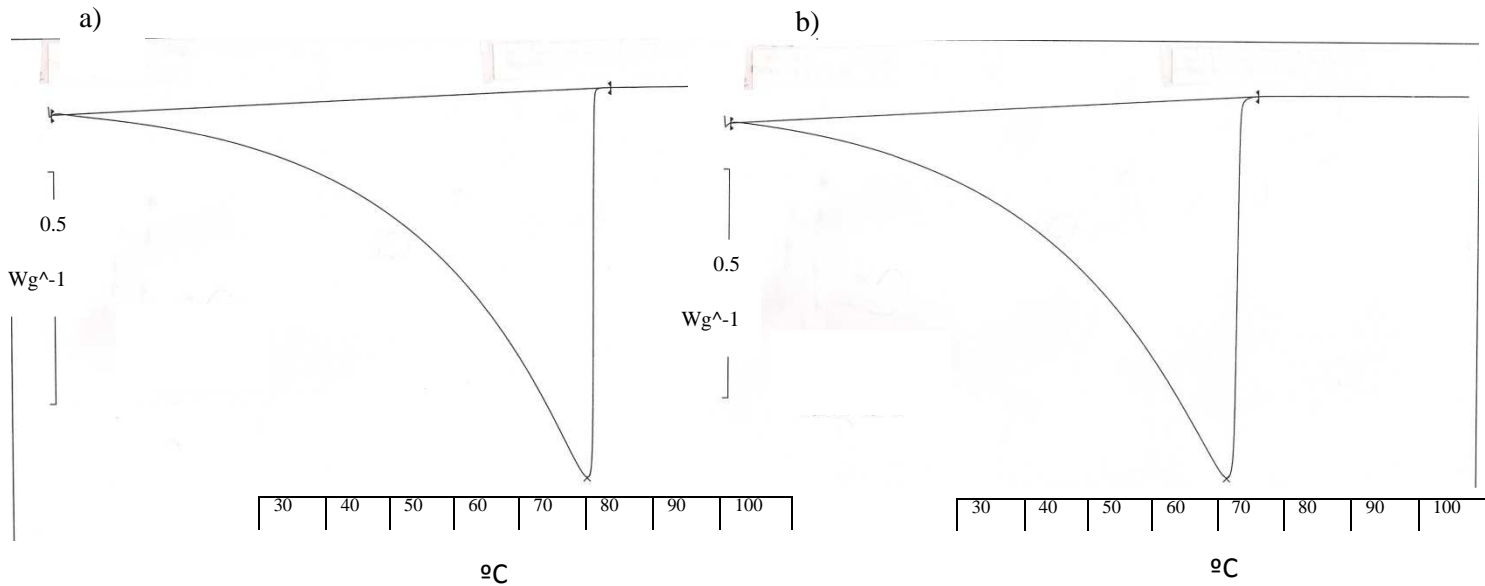


Fig. 6. Calorimetría diferencial de barrido de geles de fibrinógeno (a) y γ -globulinas (b) sintetizados a pH neutro a partir de soluciones liofilizadas.

Las temperaturas de transición fueron de 80.22 ± 0.9 °C para los geles de fibrinógeno y de 72.72 ± 0.5 °C para los geles de la F2. Comparando estos resultados con los obtenidos de los barridos de temperatura (83.05 ± 1.2 °C, para los geles de la F1 y 72.92 ± 0.7 °C, para los de la F2) podemos concluir que los geles de fibrinógeno resultan más resistentes a la desnaturalización térmica que los de γ -globulinas.

3.3.3. Medida del tamaño de las partículas

La figura 7 muestra las curvas de distribución del tamaño de las partículas de los geles de fibrinógeno γ - globulinas:

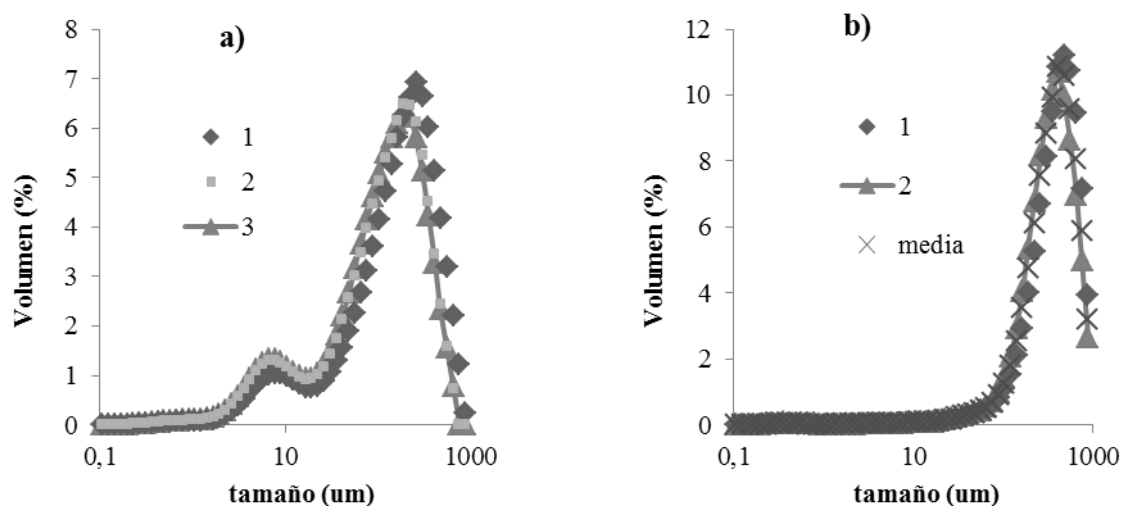


Fig. 7. Curvas de distribución del tamaño de las partículas de geles de fibrinógeno (a) y γ -globulinas (b) sintetizados a pH neutro a partir de soluciones liofilizadas.

La distribución de tamaños de las partículas que constituyen estos geles muestra curvas bimodales para los geles de la F1 y unimodales para los de la F2. En cuanto al diámetro medio de las partículas, los resultados que aparecen en la Tabla 7 muestran que el tamaño medio de las partículas ($d_{4,3}$) de los geles de la F2 supera al de los geles de la F1 (hecho que puede corroborarse con las imágenes de microscopía electrónica).

Tabla 7. Tamaño de las partículas ($d_{4,3}$, D50/90 and D10/50) de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas. Se muestran los valores medios \pm DS (Desviación Standard)

Geles	pH	$d_{4,3}(\mu\text{m})$	D50/D90	D10/D50
F1	7	162.40 \pm 0.5	0.35 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01
F2	7	363.09 \pm 0.8	0.53 \pm 0.05	0.38 \pm 0.01

Del mismo modo, los cocientes D10/50 y D50/90 ponen de manifiesto que los geles de γ -globulinas presentan un mayor número de moléculas de gran tamaño que los geles de fibrinógeno.

3.3.4. Microestructura

La figura 8 muestra las imágenes de los geles de las fracciones plasmáticas 1 y 2 obtenidas a través del microscopio electrónico de barrido. En ellas las áreas grises muestran los agregados de proteínas y los espacios negros representan los poros en la red del gel que contienen la fase acuosa (Salvador et al., 2009).

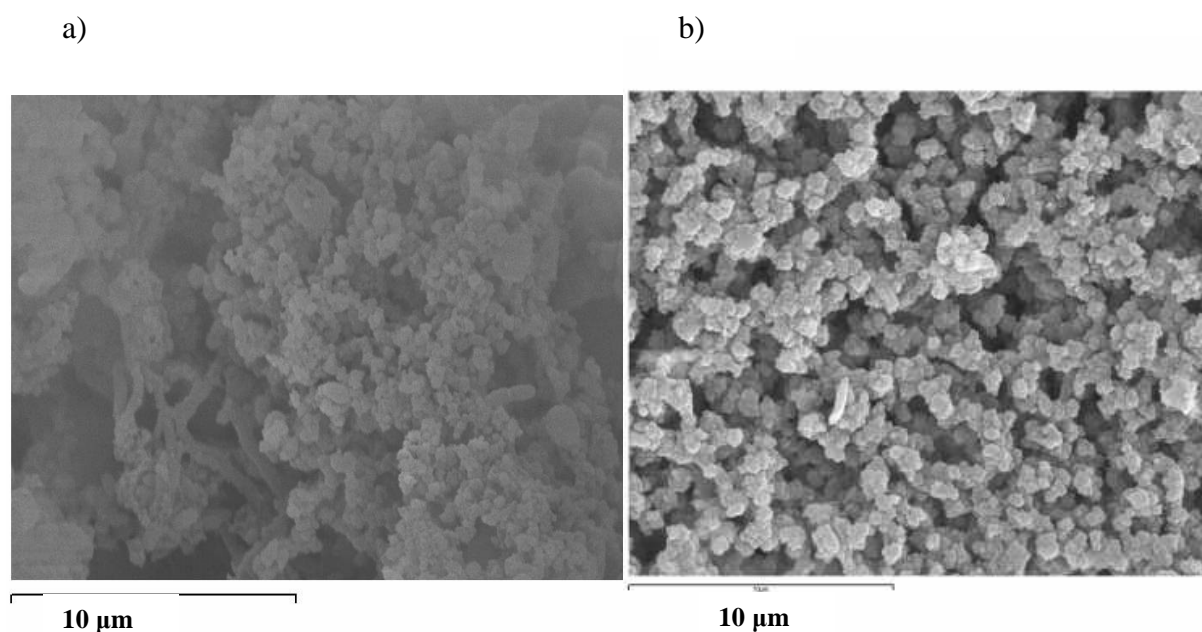


Figure 8. Micrografías electrónicas de barrido de geles de fibrinógeno (a) y γ -globulinas (b) sintetizados a pH neutro a partir de soluciones liofilizadas.

Al observar las micrografías se puede distinguir que, en ambos casos, aparecen pequeños agregados proteicos con diminutos espacios entre ellos, siendo mayor el tamaño de las partículas y de los espacios entre ellas en los geles de la F2 que en los de la fracción F1.

3.3.5. Medida de la capacidad de retención de agua

Estos geles han sido desarrollados para ser utilizados como películas para proteger los productos alimenticios, por tanto, la capacidad de retención de agua (CRA) es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta. Los resultados obtenidos fueron ajustados a la ecuación (3):

$$\% \text{ de pérdida de la CRA} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100$$

En general, cuanto más abierta es la estructura menor es la capacidad de retención de agua (Salvador et al., 2009). Este comportamiento puede observarse en los geles de ambas fracciones, ya que los geles de fibrinógeno, que muestran una estructura más compacta, presentan un % de pérdida de agua mucho mayor que los geles de γ -globulinas (como puede observarse en la Tabla 8).

Tabla 8. Humedad y % de pérdida de la CRA de geles de las fracciones plasmáticas 1 y 2 a pH neutro. Se muestran los valores medios \pm DS (Desviación Standard)

Geles	% de pérdida de la CRA		Humedad (%)
	Días		
	1	30	
F1	74 \pm 0.9	12.19 \pm 0.5	83.43 \pm 2
F2	4.9 \pm 0.02	0.125 \pm 0.02	91.91 \pm 1

Este hecho convierte a los geles de la F1 en sumamente adecuados para proteger productos alimenticios que necesiten películas con una menor humedad y una gran pérdida de agua (como por ejemplo los productos de panadería). Por su parte, los geles de la F2 gracias a su alto porcentaje de humedad y a su alta capacidad de retención de agua serían más adecuados para alimentos como los patés.

3.3.6. Aplicaciones potenciales de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas

Los resultados obtenidos de la caracterización físico-química de estos geles muestran que podrían tener múltiples aplicaciones en la industria alimentaria. En primer lugar podrían ser usados como aditivos, ya que presentan un alto contenido en proteínas y una buena capacidad de retención de agua. Además, gracias a su buena capacidad gelificante, podrían emplearse como espesantes. Sin embargo, existe una aplicación con grandes posibilidades de uso y que pasa por emplear estos geles como películas para proteger productos alimenticios. Esto es posible gracias a su excelente resistencia, elasticidad y capacidad de retención de agua.

4. Conclusiones

Los resultados muestran que los geles sintetizados a partir de soluciones de fibrinógeno y γ -globulinas podrían utilizarse como películas para recubrir productos alimenticios o como materiales espesantes y para la retención de agua. Las soluciones liofilizadas de ambos geles fueron las que produjeron los geles más resistentes. Para todas las muestras estudiadas el módulo elástico (G') superó al viscoso (G'') y, en general, el punto de gelificación se incrementó al aumentar el pH. Tanto los geles sintetizados a partir de soluciones liofilizadas de la F1 como los sintetizados a partir de soluciones liofilizadas de la F2 presentaron un comportamiento pseudoplástico a pH neutro y dilatante a pH 10. En general, ambos tipos de geles presentaron un comportamiento visco-elásticos, siendo los geles de la F1 sintetizados a partir de soluciones liofilizadas a pH básico y los geles de la F2 sintetizados a partir de soluciones liofilizadas a pH neutro son los que han presentado una mayor resistencia a la deformación. Los geles sintetizados a pH neutro y a partir de soluciones liofilizadas fueron los que mejores resultados obtuvieron en la caracterización reológica. En ambos tipos de geles los análisis de calorimetría diferencial de barrido corroboraron los resultados obtenidos a partir de las determinaciones reológicas. Los geles sintetizados a partir de soluciones de fibrinógeno exhibieron curvas de distribución del tamaño de las partículas bimodales, mostraron una microestructura formada por pequeñas partículas con apenas espacios entre ellas y una baja capacidad de retención de agua. Por su parte, los geles sintetizados a partir de soluciones de γ -globulinas exhibieron curvas unimodales, una microestructura bastante semejante a los anteriores y una alta capacidad de retención de agua. Esto hace que los geles de la F1 puedan emplearse como ingredientes alimenticios, espesantes y como películas para recubrir productos con escasa humedad (como por ejemplo productos de panadería). En cambio los geles de la F2, aunque también podrían usarse como ingredientes alimenticios y espesantes, serían más adecuados como películas para recubrir productos con una mayor humedad.

5. Referencias

- Chantrapornchai, W., McClements, D.J. (2002). Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 16 (5), 467-476.
- Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2006). Heat induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76, 216-225.
- Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78, 522-528.

Dolz, M., Hernández, M. J. & Delegido, J. (2006). Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22, 421-247.

Cordobés, F., Partal, P. & Guerrero, A. (2004). Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels. *Rheological Acta*, 43, 184-195.

Gras, J. (1983). *Plasma proteins*. Barcelona, Spain: Lims.

Harris, E. R. V. (1989). *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University.

Kneifel, W., Paquin, P., Albert, T., Richard, J.P. & (1991). Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects-a review. *Journal of Dairy Science*, 74(7), 2027-2041.

Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., & Díaz, M. (2009). Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *Journal of Food Engineering*, 97, 243-252.

Lamsal, B.P., Jung, S., & Johnson, L.A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

MOURE

Murata, M., Tani, F., Higasa, T., Kitabatake, N., & Doi, E. (1993). Heat-induced transparent gel formation of bovine serum albumin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(1), 43-46.

Nuthong, P., Benjakul S. & Prodpran T. (2009). Effect of some factors and pretreatment on the properties of porcine plasma protein-based films. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 1545-1552.

Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influence by pH. *Journal of Food Science*, 63(6), 958-961.

Saguer, E., Fort, N., Álvares, P. A., Sedman J., & Ismail, A. (2008). Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. *Food Hydrocolloids* 22(3), 459-467.

Salvador, P., Toldrá, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2008). Microstructure- function relationships of heat induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1654-1659.

Silva, V., & Silvestre, M. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36(7), 709-718.

Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. USA: FreemanPress.

Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa- Cánovas, G.V., (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 147-156.

Wang, C., & Damodaran, S. (1991). Thermal gelation of globular proteins: influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 433-438.

Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., & Jammong, P. (2006). β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 68-78.

Yasuda, K., Nakamura, R., & Hayakawa, S. (1986). Factors effecting heat-induced gel formation of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, 51(5), 1289-1292.

Rheological characterization of thermal gels of α - and β -globulins from porcine blood plasma

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz*
Department of Chemical Engineering and Environmental Technology,

*Corresponding author. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.
E-mail address: mariodiaz@uniovi.es(M. Díaz)

Abstract

Porcine plasma and its protein fractions are by-products of the meat industry with numerous potential applications. In the present paper, the gelling properties of α - and β -globulins have been studied. These proteins, which represent fraction 3 (F3) of the Cohn method of isolation of plasma proteins, were obtained via a modification of this method and could be used as films to protect food products due to their good gelation properties. The aim is to develop a useful film presenting good values of hardness, elasticity and water holding capacity. For this purpose, gels made from F3 protein solutions were prepared under different conditions (at pH 2, 7 and 10). The rheological characteristics of these gels were evaluated, as well as their thermal properties, particle size and microstructure. Additionally, the effect of lyophilization on the rheological characteristics of α - and β -globulin gels was evaluated. Results showed that both type of gels, i.e. those made from fresh and from lyophilized protein solutions, were more elastic than viscous and that, in general, the gelation point dropped as pH decreased. Gels made from fresh F3 solutions at pH 7 and 10 presented a pseudoplastic (shear-thinning) behavior, while gels made from lyophilized F3 solutions at the same pH were dilatant (shear-thickening). In all cases, the samples exhibited a viscoelastic response. DSC analysis corroborated the results obtained from rheological determinations, while size distribution measurements displayed bimodal curves for all the films. α - and β -globulin films presented a high moisture content and a good WHC.

Key words: gel, globulins, rheology, pH, microstructure.

1. Introduction

Blood plasma is widely used in the food industry due to its functional properties (Del Hoyo, Rendueles & Díaz, 2007). Among the excellent properties exhibited by blood plasma, its gelling ability may be highlighted because it allows the preparation of many foodstuffs and could even be exploited to develop new products for covering foods. There are many reports on

the gelling properties of plasma proteins (Parés, Saguer, Sauriña, Suñol & Carretero, 1998; Dávila, Parés, Cuvelier & Relkin, 2007; and Saguer, Fort, Álvares, Sedman & Ismail, 2008). Nevertheless, comprehensive rheological studies of the gels made from single porcine plasma protein fractions have barely been carried out. The gelling ability that blood plasma exhibits is a complex sum of the properties of its individual constituents, the interaction between them and also their physicochemical conditions. The formation of gels occurs when denatured molecules aggregate to form an organized protein network. It is widely known that heat treatment is indispensable to achieve gelation in the majority of cases. The properties of gels are influenced by many factors such as pH, protein concentration or pretreatments of proteins (Silva & Silvestre, 2003). It has likewise been proved that the presence of salts improves gelling capacity (Oshodi & Ojokan, 1997).

To carry out the separation of blood proteins, it is necessary to separate the liquid fraction of the blood –plasma (Harris, 1989)– from the cellular fraction. Most proteins in blood are found in the plasma, except hemoglobin, which is the major protein in the cellular fraction (Gras, 1983). Blood plasma was separated into four different protein fractions using a modification of the Cohn method (Cohn, 1948). This procedure is based on a selective precipitation method using different ethanol concentrations. Fraction 1 (F1) basically comprises fibrinogen, fraction 2 (F2) mainly γ -globulins, fraction 3 (F3) mostly α - and β -globulins and fraction 4 (F4) albumin.

In this research work, gels made from F3 were developed in order to study their possible use as food protection films. Globulins are globular proteins that present electric mobility in charged solutions. α -globulins present the highest migration, while β -globulins are situated somewhere between α and γ -globulins. A heat treatment was needed to prepare the aforementioned gels and different pH were chosen to simulate the acidity of products such as lemons, plums and certain jams (which present a pH of around 2), the neutrality of pork, chicken and fresh fish (pH of around 7) or the basicity of egg whites (pH of around 10).

Rheology is needed to characterize these new films in view of the fact that rheological stability is considered an important quality parameter (Tabilo-Munizaga & Barbosa-Cánovas, 2005). Different rheological tests provide valuable information about these gels. Temperature sweeps enable us to determine at what temperature F3 solutions undergo a phase transition from liquid to gel, flow curves reveal the behavior of the samples and creep and recovery tests allow us to understand the internal structure of the gels and the structural variations associated with the

introduction of changes in their composition (Dolz, Hernández & Delegido, 2006). To complete the characterization of these gels, rheological results were compared with those obtained from differential scanning calorimetry (DSC), which is a thermoanalytical technique in which the difference in the amount of heat required to increase the temperature of an F3 gel and a reference gel is measured as a function of temperature. Particle size measurements and SEM images likewise constitute techniques that can enable us to improve our knowledge of the microstructure of F3 gels.

The aim of this study was the rheological characterization of α - and β -globulin (F3) gels in order to evaluate them as possible films for protecting food products. To achieve this purpose, different rheological tests were performed, such as temperature sweeps, stress sweeps, flow curves and creep and recovery tests. In addition, differential scanning calorimetry, particle size and scanning electron microscopy (SEM) measurements were also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Plasma

The porcine blood used in this study was obtained from the Junquera Bobes slaughterhouse (Noreña, Asturias, Spain). As the animal was bled, blood was taken and an anticoagulant such as sodium citrate (Panreac) was quickly added at a concentration of 1% w/v. The blood was then centrifuged at 10000xg for 10 minutes in order to separate the plasma (60% in volume) from the cells (40%) in a centrifuge Kubota 6700 using 250 mL tubes. The plasma thus obtained was kept at 4 °C to avoid bacterial proliferation.

2.2. Fractionation of plasma

Separation of the different fractions from plasma was carried out following a modification of the Cohn technique (Moure, Rendueles & Díaz, 2004). The process flow diagram is shown in Figure 1. Samples were kept at 0 °C during fractionation. Ethanol was added very slowly, stirring constantly to avoid the precipitation of proteins belonging to the other fractions.

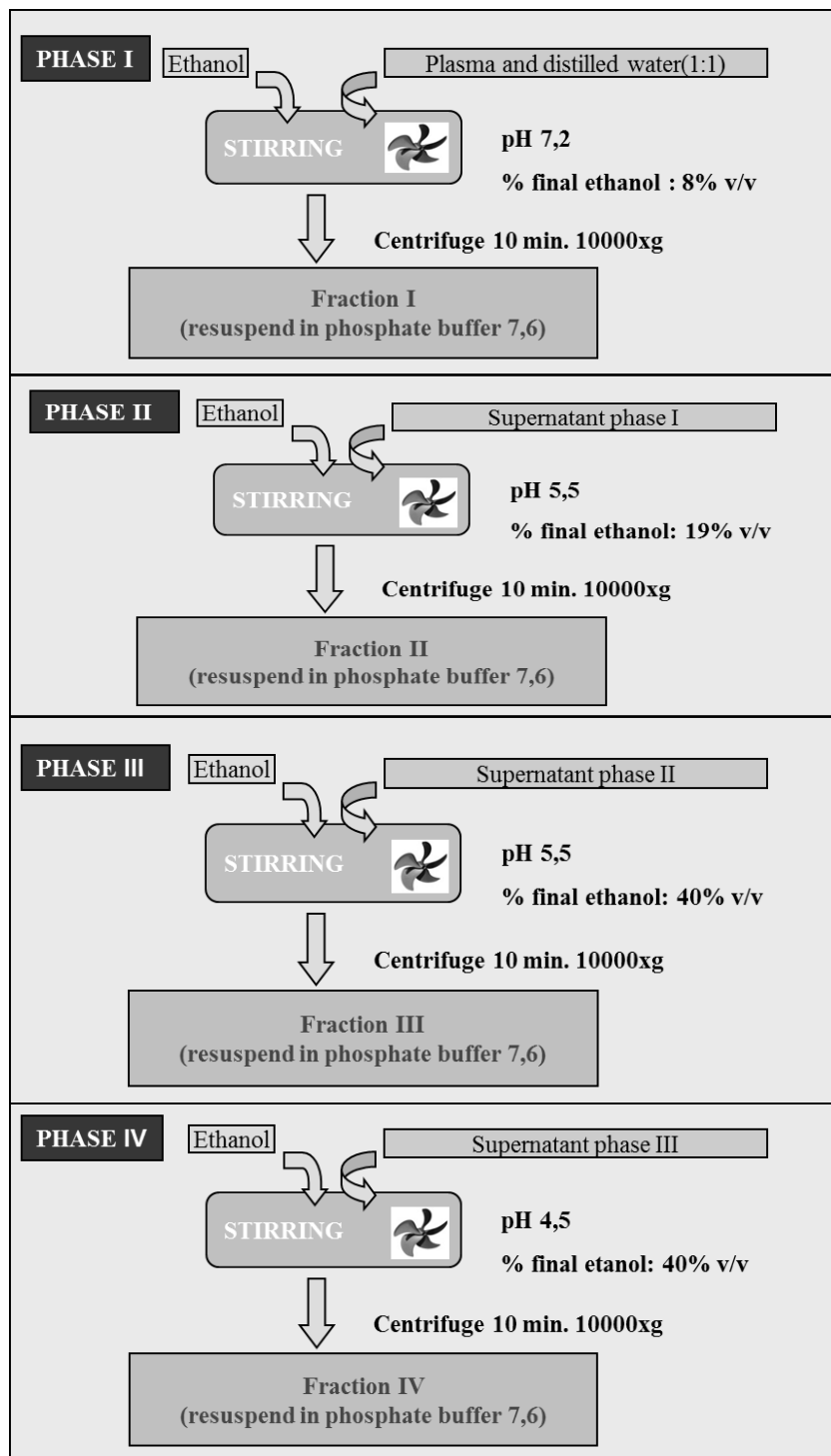


Figure 1. Flow diagram of plasma proteins fractionation.

Once the different fractions had been obtained, samples of each one were freeze-dried to $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 0.1 mbar in a Telsta Cryodos Lyophilizator. Samples were frozen to $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to lyophilization. The dry extract of lyophilized samples was approximately 96 % (w/w).

2.3. *Fraction characterization*

In order to identify the proteins present in each fraction, a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out. The fractions were diluted 1:25 (v/v) in a dissociation buffer consisting of a 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.05% bromophenol blue, 35% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 8% (w/v) SDS solution and heated in boiling water for 5 min. Electrophoresis was carried out on polyacrylamide gels (stacking 3:5% and resolving 12%) with a migration buffer consisting of a 0.02M Tris(hydroxymethyl)aminomethane, glycine 5M, SDS (w/v) 0.1% solution. Proteins were stained following the usual staining procedure (Coomassie blue 0.1%, methanol 50%, acetic acid 10% and water 40%). Gels were destained in a solution containing acetic acid (10%), methanol (40%) and water (50%). Broad Range SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Bio-Rad) were used as proteins standards.

Each fraction obtained was analyzed in order to quantify its protein content following the Lowry method (Lowry, 1951) and the amount of total solids using a Mettler Toledo HR73 moisture analyzer. To carry out the analysis, the four fractions were redissolved in a volume of buffer equal to the starting plasma.

2.4. *Preparation of α - and β -globulin gels*

Fresh and lyophilized protein solutions were prepared in distilled water to obtain a protein concentration of 10% (w/w) and the pH solutions were adjusted to 2, 7 and 10 using either 0.5M HCl or 0.5M NaOH. Protein solutions were placed on 80 mm diameter glass plates (TDS Pierron), adding approximately 3 g of solution, and were subsequently heated in an incubator (J.P. Selecta 2000209) to 85 ± 1 °C for 45 min. After heat-induced gelation, samples were immediately cooled to 20 ± 1 °C for 15 min and stored at 4 ± 1 °C for 24 hours before being analyzed.

2.5. *Characterization of α - and β -globulin gels*

Several physical and chemical analysis were carried out to characterize the F3 gels.

2.5.1. *Rheological determinations*

Rheological tests were carried out on a Haake MARS II rotational rheometer equipped with a Peltier unit to control the temperature. To avoid slippage, a serrated plate/plate measuring system (PP35) was used, with a 1 mm gap. All tests (except the temperature tests and flow curves) were carried out at 20 ± 0.1 °C. Before taking any measurements, samples rested for at

least 15 min, allowing the stresses induced during sample loading to relax (Laca, Sáenz, Paredes & Díaz, 2009). Glass hoods and silicone oil were used to avoid sample desiccation during the analyses. Samples were analyzed in triplicate.

Steady state flow curves were obtained in Controlled Stress (CS) mode at $6\pm 1^\circ\text{C}$ from 0 to 50 Pa shear stress. These tests allowed us to classify the different types of fluids. A general relationship to describe the behavior of non-Newtonian fluids could be the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996):

$$\tau = \tau_0 + k\gamma^n \quad \text{Herschel-Bulkley Law (1)}$$

where τ is the shear stress (Pa), τ_0 the yield point (Pa), γ the shear rate (s^{-1}), k the consistency coefficient ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$) and n is the flow behavior index (dimensionless). This equation is very convenient because Newtonian fluids, shear-thinning fluids (when $0 < n < 1$), shear-thickening fluids (when $1 < n < \infty$) and Bingham plastic fluids may be considered special cases of the Herschel-Bulkley model (as can be seen in Table 1).

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996)

Fluid	k	N	τ_0
Herschel-Bulkley	>0	$0 < n < \infty$	>0
Newtonian	>0	1	0
Shear-thinning (pseudoplastic)	>0	$0 < n < 1$	0
Shear-thickening (dilatant)	>0	$1 < n < \infty$	0
Bingham plastic	>0	1	>0

Creep and recovery tests were carried out under transient conditions to study the internal structure of the gel. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at $20\pm 1^\circ\text{C}$. The recovery tests, also at $20\pm 1^\circ\text{C}$, lasted 180 seconds. One of the most widely used models that reflects the deformation of a system is the four-parameter Burger model, which represents the association of purely elastic or purely viscous behavior in series (Maxwell model) or in parallel (Kelvin-Voigt model). In the Burger model, the system deformation, called compliance (J), corresponds to the following equation (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (2)$$

where J_0 is the instantaneous compliance, J_1 the retarded compliance, λ_{ret} the retardation time (time to achieve maximum strain) and μ_0 is the Newtonian viscosity of the free dashpot. The sum of J_0 and J_1 is called the steady state compliance, J_{0e} , while λ_{ret} represents the ratio μ_0/G_0 , where G_0 is the instantaneous elastic modulus of the Maxwell unit.

Knowing the values of J_{0e} , μ_0 , G_0 and λ_{ret} enables us to compare the structure of the F3 gels, yielding a mechanical model of behavior in response to deformation.

Under dynamic conditions, stress sweeps were performed from 0.01 to 500 Pa at a frequency of 1 Hz, thus showing the linear viscoelastic range of the F3 gels. Temperature sweeps allowed us to ascertain the temperature at which F3 solutions undergo a phase transition from liquid to gel. These sweeps were conducted in the previously established linear viscoelasticity range. In both cases, the frequency employed was 1 Hz and the temperature ramps were carried out as follows: temperature was increased (at a heating rate of 0.6 °C/min) from 20 °C to 110 °C, subsequently cooling the samples to 0 °C (0.6 °C/min). The effect of different temperatures (from 0 to 100 °C, at a heating rate of 0.6 °C/min) on the produced gels was then analyzed. These tests were carried out in CS mode at a constant shear stress of 10 Pa. Although experimental detection of the gel point is not easy in practice, Cordobés (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004) suggested that the gel point occurs at the time at which G' (the storage modulus) and G'' (the loss modulus) cross each other at a given frequency (Sánchez & Burgos 1997; Pilosof, 2000). The gel point was determined in this way in the present study.

2.5.2. *Chemical analysis*

The following parameters were analyzed and determined in each sample in triplicate: pH, using a Crison micropH 2001 pHmeter; moisture content, on an HR73 Halogen Moisture Analyzer; protein concentration by means of the Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951); and absorbance, using a Shimadzu UV 1203 UV-Vis spectrophotometer at 500 nm.

2.5.3. *Differential scanning calorimetry (DSC) measurements*

Differential scanning calorimetry tests were carried out in hermetically sealed aluminum pans. A DSC 822e (Metler Toledo) apparatus was used, performing temperature ramps from 25 °C to 120 °C at a heating rate of 0.6 °C/min. Subsequently, a second scan from 25 °C to 120 °C was used to check the irreversibility of the reaction changes. The heating rate was approximately the same as that employed in the temperature tests for the reason that the gelling temperature is strongly influenced by the temperature ramp (Donovan, Mapes, Davis & Garibaldi, 1975). As a

well pronounced endothermic peak coincides with the moment of coagulation (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004), the gelation temperature (T_g) of the F3 gels made from fresh solutions was determined in this way. Analyses were carried out in duplicate.

2.5.4. Particle size determination

F3 gels were analyzed on a particle size analyzer (Malvern Mastersizer S) following the procedure described by Worrasinchai (Worrasinchai, Supphantharika, Pinjai & Jammong, 2006). Particle size measurements are reported as the volume-weighted mean diameter: $d_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$, where n_i is the number of particles of diameter d_i . In addition, there are two relations that allow us to determine the degree of dispersion of particle sizes: D10/D50 and D50/D90, where D50 ($d_{4,3}$) is the average particle diameter value and D90 represents the equivalent diameter where 90 % of the powder particles has a smaller diameter. When the value of these ratios is equal to unity, the distribution is monodisperse, whereas the system can become highly polydisperse when these ratios tend to be small. Samples of F3 gels were stored at refrigerating temperature (4° C). Two different samples of each gel were measured, each sample being measured in triplicate.

2.5.5. Scanning electron microscopy (SEM)

Transversal sections of F3 gels made from fresh solutions were characterized by scanning electron microscopy using a JEOL Deba-6100 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). All samples, weighing approximately 0.5 g, were submitted to chemical fixation in 0.025 M Phosphate buffer (pH 6.8, Panreac) with 3% v/v glutaraldehyde (Panreac). After 1 hour, the samples were washed twice with the same phosphate buffer for 15 minutes. They were then dehydrated by immersion for 15 minutes in aqueous solutions with increasing concentrations of ethanol: 20, 40, 60, 80 and 100 (twice) % v/v absolute ethanol (Panreac) in water. After that, the samples were transferred to 100% acetone (Panreac) in a similar way (30, 50, 70, 90 and 100 (twice) % v/v acetone in ethanol, 10 minutes each solution) and critical point dried with liquid CO₂ (Balzers CPD 030, BAL-TEC AG, Fürstentum, Liechtenstein). After drying, the samples were mounted on small carbon-tape double-sided aluminum brackets and were bombarded with gold in a vacuum evaporator (Balzers SCD004, (BAL-TEC AG).

2.5.6. Water Holding Capacity (WHC)

WHC measurements were conducted by means of centrifugation tests following the method reported by Kneifel (Kneifel, Paquin, Albert & Richard, 1991). In the present study, 1 g of

sample was centrifuged at 20000xg for 5 min in a Kubota 6700 centrifuge, subsequently weighing the amount of water released. Measurements were carried out in triplicate.

The WHC was determined in terms of the percentage of water loss in the samples according to the equation reported by Chantrapornchai & McClements (Chantrapornchai & McClements, 2002):

$$\% \text{ loss} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

where m_i is the initial mass of the sample and m_f is the mass after centrifugation.

3. Results and discussion

3.1. *Characterization of fractions*

After fractionation of the plasma following the process indicated in Table 1, an SDS-PAGE was carried out in order to identify the four plasma protein fractions. The electrophoresis gel is shown in Figure 2. Lane 1 in this figure corresponds to fibrinogen (F1), while lane 2 corresponds to fraction 2 (F2), which is represented by several proteins, the majority being γ -globulins. Lane 3 corresponds to fraction 3 (F3), which is quite similar to fraction 2, though in this case the main proteins of this fraction are α - and β -globulins. Lane 4 corresponds to albumin (F4).

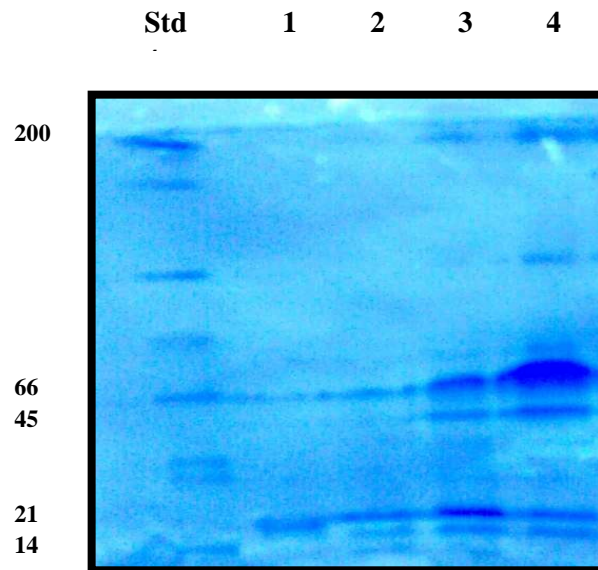


Figure 2. SDS-PAGE of fractions obtained from plasma; lane 1: Fraction 1 (Fibrinogen); lane 2: Fraction 2 (γ -globulins); lane 3: Fraction 3 (α and β -globulins); lane 4: Fraction 4 (seroalbumins).

To complete the characterization of the fractions, protein quantification and the total solids content of each fraction are shown in Table 2.

Table 2. Protein and total solids content of the four plasma fractions

	Plasma	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4
Protein content (%)	7.35	0.18	2.8	1.6	2.6
Total solids content (%)	8	0.20	3.1	1.8	2.7

Fraction 1 presented the lowest protein content, while fractions 2 and 3 jointly represented more than 60% of this content. The protein content constitutes over 95% of the total solids of each fraction. This high protein content of the solids is due to the previous removal of fat during centrifugation.

3.2. Characterization of fraction 3 gels

Following the methodology outlined previously, fresh and lyophilized gels made from the F3 solutions were prepared, obtaining good results for all the pH assayed. These gels need to be characterized to reveal their potential applications.

3.2.1. Rheological measurements

Different rheological tests were carried out to optimize the development of these new products, not only as thickeners, but also as films to cover food products. Whatever their final use, their rheological stability is considered an important quality parameter.

A. Temperature sweeps

In this study, the temperature was increased from 20 °C to 110 °C (at a heating rate of 0.6 °C/min), subsequently cooling samples to 20 °C. During gelation, F3 solutions undergo a phase transition from liquid to gel. The results obtained from the temperature sweeps are given in Figure 3. G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) were determined as functions of temperature at a fixed frequency.

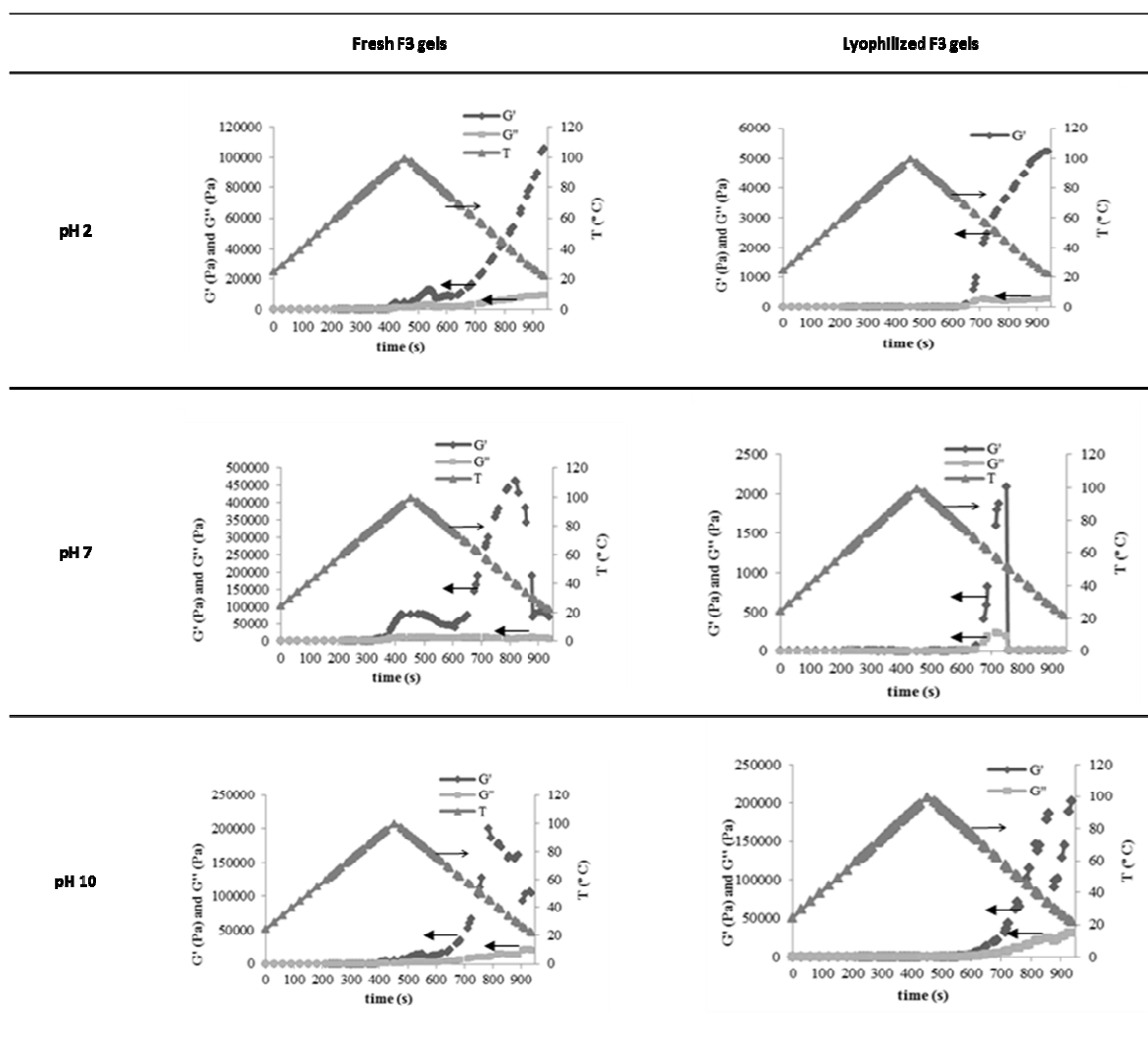


Figure 3. Temperature sweeps of F3 gels made of fresh and lyophilized solutions at pH 2, 7 and 10.

Results showed that both moduli, G' and G'' , were higher at neutral pH for fresh samples. However, the opposite occurred in the case of lyophilized samples, in which gels synthesized at neutral pH showed the lowest resistance. This could be due to the changes that the lyophilization process produced in the samples.

As outlined previously, the gels were heated and then cooled. During cooling, the storage (G') and loss (G'') moduli were nearly constant until reaching a certain temperature at which G' and G'' rapidly increased, thus indicating transition from a liquid-like state (sol) to a solid-like state (gel). This temperature is usually taken as the gelation temperature and is one of the common methods for detecting the gelling point in the absence of a crossover between G' and G'' (Lamsal, Jung & Johnson, 2007). Gel points were determined in this way in the present study for fresh and lyophilized samples. Results are shown in Table 3. It should also be noted that the gels prepared at pH 7 and 10 showed significant decreases in their G' and G'' moduli during the cooling ramps.

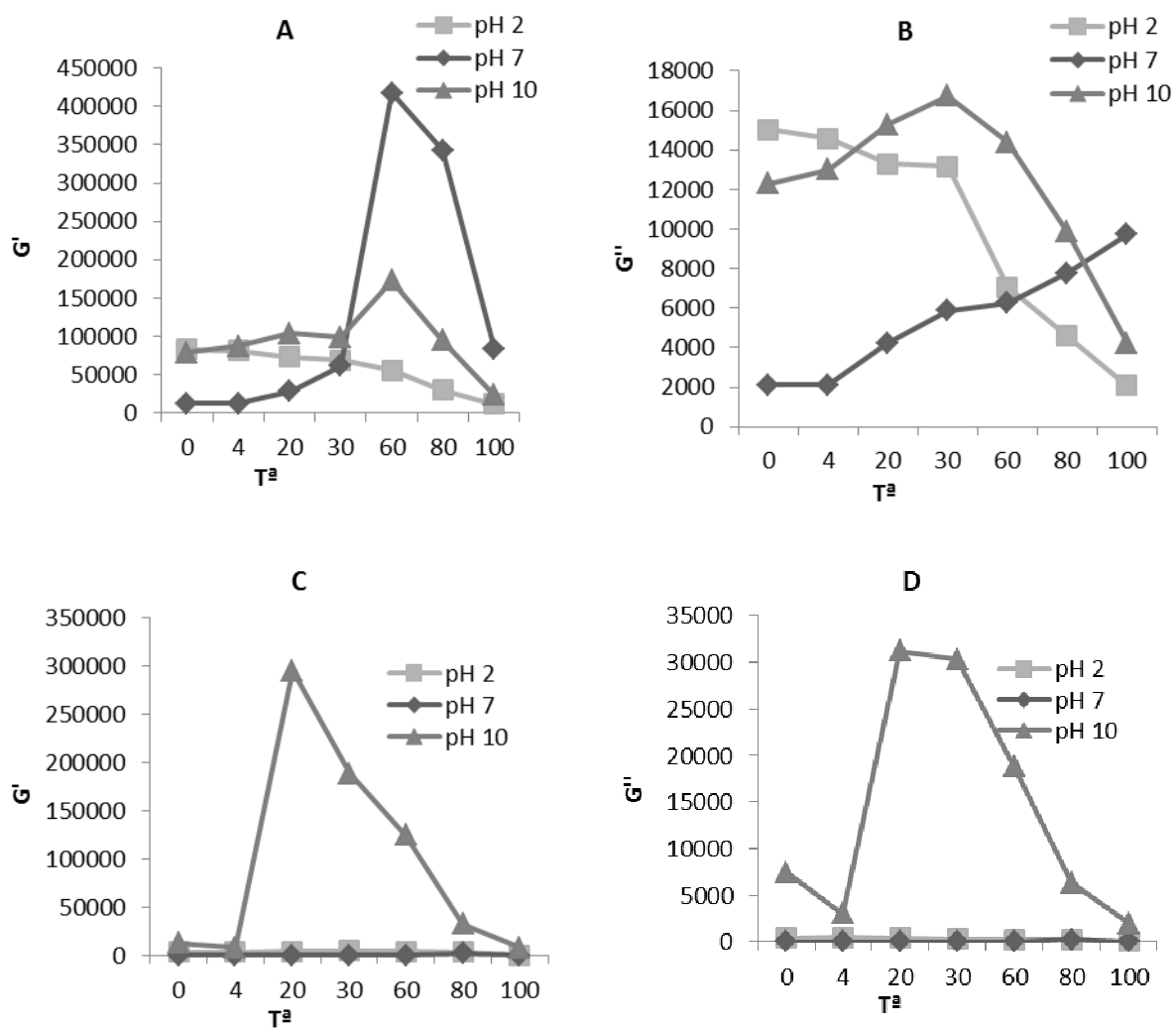
Table 3. Gelling points of gels made from fresh and lyophilized solutions obtained by means of temperature sweeps

	pH	Gel point (Graphics) (°C)
Gels made from fresh globulin solutions	2	72.8±0.7
	7	60.8±0.8
	10	78.2±1.1
Gels made from lyophilized globulin solutions	2	69.3±0.5
	7	76.3±0.7
	10	77.1±0.7

The gelation point dropped as pH decreased for lyophilized gels. This behavior has been reported as a consequence of the net charge repulsion (Murata, Tani, Higasa, Kitabatake & Doi, 1993) and the formation of β -sheet structures at different temperatures (Wang & Damodaran, 1991; Yasuda, Nakamura & Hayakawa, 1986). However, for gels made from fresh F3 samples, the gelation points were lower than expected, which is highly advantageous due to the fact that a lower heating cost is required to obtain the films.

Having studied gel formation, the effect of different temperatures (from 0 °C to 100 °C, at a heating rate of 0.6 °C/min) on the G' and G'' moduli of formed gels was analyzed. These temperatures were chosen to simulate the different situations that the gels might need to support when protecting food products, such as refrigerating temperatures, room temperatures or the high temperatures that may be reached when protecting heat-processed foods. As can be seen in

Figure 4, all the gels made from fresh and lyophilized solutions at pH 7 showed the highest values of G' and G'' at high temperatures. This fact makes these gels very suitable for protecting heat-treated foods. On the other hand, the gels synthesized at pH 2 showed the highest values of both moduli at refrigerated temperatures. The gels produced at pH 10 offered greater resistance to deformation between 20 to 60 °C.



4.

Figure 4. Effect of different temperatures on the G' and G'' moduli of formed gels. G' of gels made of fresh solutions (A), G'' of gels made of fresh solutions (B), G' of gels made of lyophilized solutions (C), G'' of gels made of lyophilized solutions (D).

A. Flow curves

Flow curves were performed in CS mode at 6 ± 1 °C from 0 to 50 Pa of shear stress. Data obtained from the flow curves were fitted to Equation 1. The characteristics values of n and k are shown in Table 4. All data display a good correlation with Equation 1 ($R^2 = 0.99$).

Table 4. Values of the behavior index (n) and consistency index (k) of gels made from fresh and lyophilized solutions at different pH. Average values \pm SD are reported

	pH	n (dimensionless)	k (Pa.sn)	Fluid
Gels made from fresh globulin solutions	2	5.589 \pm 0.3	1.449e24 \pm 724	Shear-thickening (dilatant)
	7	1.995e-03 \pm 0.0002	2.433e+02 \pm 7	Shear-thinning (pseudoplastic)
	10	1.749e-03 \pm 0.0002	1.777 \pm 0.5	Shear-thinning (pseudoplastic)
Gels made from lyophilized globulin solutions	2	0.338 \pm 0.1	1.392 \pm 0.4	Shear-thinning (pseudoplastic)
	7	1.929 \pm 0.2	4.138e-06 \pm 0.00008	Shear-thickening (dilatant)
	10	2.479 \pm 0.03	3.913e+09 \pm 213	Shear-thickening (dilatant)

As stated by Steffe (Steffe, 1996), values of n and k allow us to classify the different types of fluids. These values indicate that gels made from fresh F3 solutions at pH 7 and 10 presented a pseudoplastic (shear-thinning) behavior. However, gels made from lyophilized F3 solutions at the same pH behaved in a dilatant manner (shear-thickening), which is unusual in food products because their apparent viscosity increases with increasing shear stress. The opposite behavior is observed for gels made from fresh and lyophilized solutions at pH 2.

B. Creep and recovery tests

Creep and recovery tests enable us to understand the internal structure of gels and the structural variations associated with the introduction of changes in their composition. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at 20 ± 1 °C. The recovery tests, also at 20 ± 1 °C, lasted 180 seconds.

The fitting of $J = f(t)$, based on the Burger model (Equation 2), yielded values of $r^2 \geq 0.99$ in all cases. The values of J_{0e} , μ_0 , G_0 and λ_{ret} are reported in Table 5.

Table 5. Values of the parameters of the Burger model for all the gels studied

	pH	J_{0e} (1/Pa)	μ_0 (Pa)	G_0 (Pa)	λ_{ret} (s)	r^2
Fresh F3 gel	2	2.651e-04±0.00001	4.440e+05±320	3.773e+03±4	117.7±2	0.998
	7	6.331e-02±0.005	2.738e+03±26	1.579e+01±3	173.3±3	0.994
	10	1.496e-04±0.00001	5.589e+06±280	6.685e+03±15	836.2±2	0.998
Lyoph. F3 gel	2	2.450e-04±0.00002	1.986e+06±704	4.082e+03±12	486.6±2	0.992
	7	6.465e+02±32	4.366e-03±84	1.547e-03±0.002	282.3e-02±0.2	0.999
	10	9.338e-04±0.0006	3.625e+05±268	1.074e+03±10	338.7±2	0.998

The results showed that for both types of gels, i.e. those made from fresh and from lyophilized solutions, the lowest values of μ_0 , G_0 and λ_{ret} were mainly obtained at pH 7. This could be due to the lack of repulsion charge at neutral pH. Gels prepared at pH 2 exhibited the highest values of G_0 with relatively low values of retardation time (λ_{ret}), a fact that could be explained by the elastic efforts afforded by the molecules of these gels as a result of acid coagulation.

All the samples showed a viscoelastic response, as they all exhibited a nonlinear response to strain and, due to their ability to recover some structure by storing energy, showed a permanent deformation lower than the total deformation applied to them (Steffe, 1996). Gels made from fresh solutions at pH 10 and films made from lyophilized samples at pH 2 exhibited the greatest resistance to deformation, given that the values of the parameters (μ_0 and G_0) of these gels exceeded those of all the rest. However, it should be noted that the results are more favorable for gels made from fresh solutions than for those made from lyophilized samples.

The system reached maximum deformation 60 seconds after the application of stress for said period of time. The stress was then removed. This allowed us to calculate the percentage of elastic recovery, which is shown in Table 6. Once again, gels made from fresh solutions at pH 10 and those made from lyophilized samples at pH 2 showed the best results.

Table 6. Percentage elastic recovery of gels made from fresh and lyophilized solutions at different pH

	pH	% elastic recovery
Gels made from fresh solutions	2	16.80±0.4
	7	29.08±1.4
	10	99.43±1.2
Gels made from lyophilized solutions	2	92.21±0.5
	7	11.61±0.1
	10	89.46±1.7

In almost all the tests performed, gels made from fresh solutions showed better results than those made from lyophilized samples. Accordingly, the remaining characterization only took into consideration gels made from fresh F3 solutions.

3.2.2. Thermal properties

DSC is a widely used technique for studying thermal transitions of food proteins as it provides information on the conversion from the native to the heat-denatured state. This conversion is a phenomenon that is accompanied by a significant uptake of heat that leads to an endothermic peak in the DSC thermogram (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004).

The transition temperatures of F3 gels obtained were: 77.52 ± 0.8 °C for gels at pH 2, 68.19 ± 0.7 °C for gels at pH 7 and 80.45 ± 1.2 °C for gels at pH 10. Comparing these results with those obtained from temperature sweeps (72.8 ± 0.7 °C at pH 2, 60.8 ± 0.8 °C at pH 7 and 78.2 ± 1.1 °C at pH 10), it may be concluded that the gelation point increased at low and high pH. F3 gels produced at pH 10 have been shown to be the most resistant to heat denaturation and subsequent aggregation.

3.2.3. Particle size

In order to determine how gel particle size is affected by pH, F3 gels produced at pH 2, 7 and 10 were studied. Figure 5 shows the size distribution curves of the different gels.

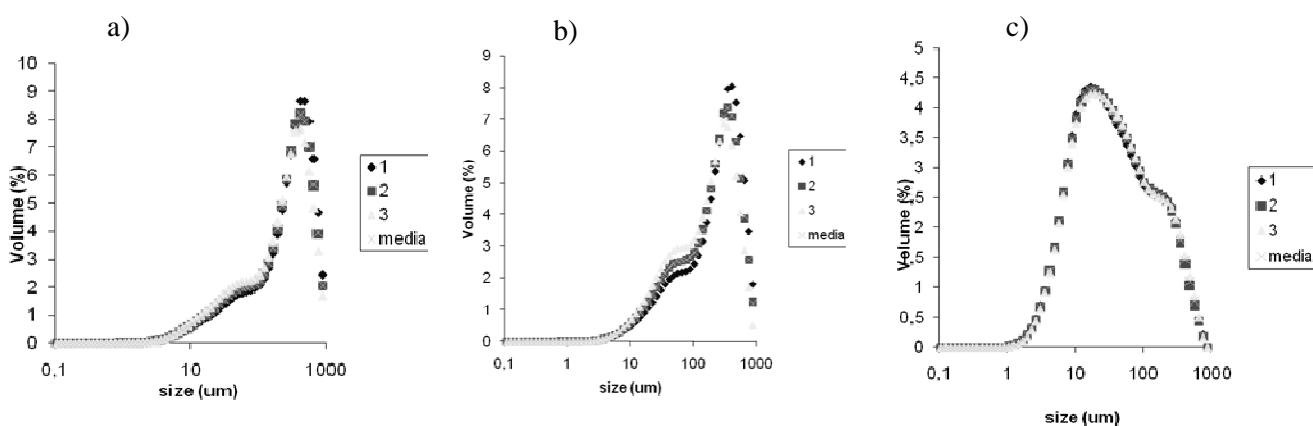


Figure 5. Size distribution curves for F3 gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

All the F3 gels displayed a bimodal curve. However, it should be noted that gels synthesized at pH 10 showed a greater number of smaller particles, while those produced at lower pH exhibited an increase in average particle size. The D50/90 and D10/50 ratios thus showed that

gels synthesized at lower pH were more monodisperse than those produced at pH 10 (as displayed in Table 7).

Table 7. Particle size ($d_{4,3}$, D50/90 and D10/50) of fresh F3 gels at the studied pH. Average values \pm SD are reported

	pH	$d_{4,3}$ (μm)	D50/D90	D10/D50
Gels made from fresh F3 solutions	2	279.50 \pm 4	0.43 \pm 0.06	0.1 \pm 0.01
	7	240.73 \pm 3	0.39 \pm 0.06	0.12 \pm 0.01
	10	66.77 \pm 0.9	0.13 \pm 0.5	0.21 \pm 0.01

3.2.4. Microstructure

Figure 6 shows the SEM images of F3 gels at pH 2, 7 and 10. Important differences in microstructure were found depending on pH. In these images, gray areas represent protein aggregates, while black spaces show the pores of the network that contain the aqueous phase (Salvador, Toldrá, Sauer, Carretero & Parés, 2008).

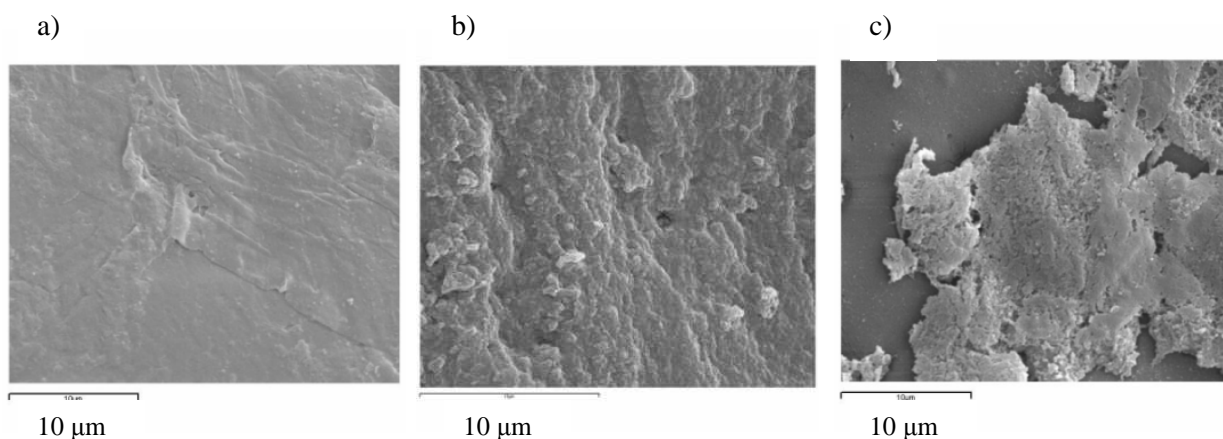


Figure 6. SEM micrographs of F3 gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

At pH 2, F3 gels formed a fine network of compact and homogeneous chains composed of large size particles. However, gels produced at pH 7 and 10 were composed of protein aggregates interspersed with cavities, the particle size decreasing with increasing pH. This behavior could be due to the acid coagulation that affected gels at pH 2.

3.2.5. *Water holding capacity*

These gels have been developed as films to protect food products, so their water holding capacity (WHC) is one of the most important quality parameters to achieve. The results obtained were fitted to Equation (3). F3 gels presented a moisture content of $97.74\pm 3\%$. The percentage loss in WHC was quite high at day 1 ($25.76\pm 2\%$), but decreased to $8.65\pm 0.9\%$ at day 30. This fact makes F3 gels suitable for protecting food products that need a high moisture content and low water loss, such as meat emulsion products.

4. *Conclusions*

Results showed that gels made from α - and β -globulins (Cohn Fraction 3) could be used as thickeners and even as films to protect food products. Gels synthesized at neutral pH resulted very suitable to protect heat-treated food. However, gels produced at pH 2 yielded the highest values of G' (elastic modulus) and G'' (viscous modulus) at refrigerated temperatures, while those synthesized at pH 10 offered greater resistance to deformation between 20 and 60 °C. Gels made from fresh F3 protein solutions at pH 7 and 10 behaved pseudoplasticly (shear-thinning) behavior, while gels made from lyophilized F3 solutions at the same pH were dilatant in behaviour (shear-thickening). All the samples showed a viscoelastic response. Gels made from fresh solutions at pH 10 and films made from lyophilized samples at pH 2 exhibited the greatest resistance to deformation, although results were generally more favorable to gels made from fresh F3 samples than those made from lyophilized solutions. SEM images revealed that films synthesized at pH 2 formed a fine network of compact homogeneous chains composed of large size particles, while gels produced at higher pH were composed of protein aggregates interspersed with cavities. F3 gels presented a high moisture content and a good WHC, making them suitable for protecting food products which need a high moisture content and low water loss. The results obtained from the physical and chemical characterization of F3 gels thus showed that these gels could have numerous applications in the food industry. They may be used as thickeners due to their good gelling properties. In addition, there is an application that has never been taken into account, which is the possibility of using these gels to cover food products. This could be possible thanks to their good resistance to deformation, elastic behavior and good WHC.

5. References

- Chantrapornchai, W., McClements, D.J. (2002). Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 16 (5), 467-476.
- Cohn, E.J. *The history of plasma fractionation*. In Advances in Military Medicine, Andrus et al. Eds. Little, Brown & Co, 1948.
- Cordobés, F., Partal, P. & Guerrero, A. (2004). Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels. *Rheological Acta*, 43, 184-195.
- Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2007). Heat induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH. *Meat Science*, 76, 216-225.
- Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78, 522-528.
- Dolz, M., Hernández, M. J. & Delegido, J. (2006). Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22, 421-247.
- Donovan, J.M., Mapes, C.J. Davis, J.G. & Garibaldi, J.A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 73-83.
- Gras, J. (1983). *Plasma proteins*. Barcelona, Spain: Lims.
- Harris, E. R. V. (1989). *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University.
- Kneifel, W., Paquin, P., Albert, T., Richard, J.P. & (1991). Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects-a review. *Journal of Dairy Science*, 74(7), 2027-2041.
- Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., & Díaz, M. (2009). Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *Journal of Food Engineering*, 97, 243-252.
- Lamsal, B.P., Jung, S, & Johnson, L.A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Moure, F., Rendueles, M., Díaz, M. (2004). Plasma protein fractionation by ion exchange chromatography. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 27 (1), 17-24.

- Murata, M., Tani, F., Higasa, T., Kitabatake, N., & Doi, E. (1993). Heat-induced transparent gel formation of bovine serum albumin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 57(1), 43-46.
- Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influence by pH. *Journal of Food Science*, 63(6), 958-961.
- Pilosofo AMR. (2000). Bartholomai GB (eds). Caracterización funcional y estructural de proteínas. Eudeba, Buenos Aires, pp 75–95.
- Saguer, E., Fort, N., Álvares, P. A., Sedman J., & Ismail, A. (2008). Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. *Food Hydrocolloids* 22(3), 459-467.
- Salvador, P., Toldrá, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2008). Microstructure-function relationships of heat induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1654-1659.
- Sánchez, C., Burgos, J. (1997). Gelation of sunflower globulin hydrolysates: rheological and calorimetric studies. *J Agric. Food Chem.*, 45, 2407–2412.
- Silva, V., & Silvestre, M. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36(7), 709-718.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. USA: FreemanPress.
- Oshodi, A. & Ojokan, E. (1997). Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry* 59, 333-338.
- Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa-Cánovas, G.V., (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 147-156.
- Wang, C., & Damodaran, S. (1991). Thermal gelation of globular proteins: influence of protein conformation on gel strength. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(3), 433-438.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., & Jammong, P. (2006). β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 68-78.
- Yasuda, K., Nakamura, R., & Hayakawa, S. (1986). Factors effecting heat-induced gel formation of bovine serum albumin. *Journal of Food Science*, 51(5), 1289-1292.

Rheological characterization of thermal gels of porcine blood plasma albumins

Pilar del Hoyo, Manuel Rendueles, Mario Díaz*

Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Oviedo, Faculty of Chemistry, C/Julián Clavería s/n, 33071 Oviedo, Spain.

*Corresponding author. Tel.: +34 98 5103439; fax: +34 98 5103434.

E-mail address: mariodiaz@uniovi.es(M. Díaz)

Abstract

Porcine plasma albumin is one of the most valuable protein fractions of this food industry by-product due to its good functional properties. In the present paper, the gelling abilities of the albumin fraction of plasma have been studied. These proteins, which represent fraction 4 (F4) of the Cohn method of isolation of plasma proteins, were obtained by a modification of this method and could be used as films to protect food products due to their good gelation properties. For this purpose, the albumin fraction was prepared at different conditions (at pH 2, 7 and 10). The rheological characteristics of the gels were analyzed, as well as their thermal properties, particle size and microstructure. Results showed that these gels could be used as thickeners or as films to protect food products. These applications are possible as all the samples resulted more elastic than viscous and, in general, the gelation point dropped as pH increased. Gels at pH 2 behaved in a dilatant manner, while gels at higher pH were pseudoplastic. In all cases, the gels displayed a viscoelastic response. DSC analysis corroborated the results obtained from rheological determinations, while size distribution measurements displayed unimodal curves for all the films. Gels made from albumin solutions presented a high moisture content and good WHC. Moreover, SEM images revealed that gels synthesized at pH 2 formed a more compact network than those synthesized at higher pH.

Key words: gel, albumins, rheology, pH, microstructure.

1. Introduction

Blood plasma is highly valued in the food industry because of its functional properties (Del Hoyo, Rendueles & Díaz, 2007). Gelling ability is one of the most widely studied properties because it allows the preparation of many foodstuffs and could even be used to develop new products for covering foods. There are many reports on the gelling properties of plasma proteins (Parés, Sagner, Sauriña, Suñol & Carretero, 1998; Sagner, Fort, Álvares, Sedman &

Ismail, 2008). However, comprehensive rheological studies of gels made solely from the albumin fraction have barely been carried out. The gelation ability that blood plasma exhibits is a complex sum of the properties of its individual constituents, the interaction between them and environmental physicochemical conditions. The formation of gels occurs when denatured molecules aggregate to form an organized protein network and it is well known that heat treatment is indispensable in most cases to achieve gelation. The properties of gels are influenced by many factors such as pH, protein concentration or pretreatments of proteins (Silva & Silvestre, 2003). It has likewise been proved that the presence of salts improves gelling capacity (Oshodi & Ojokan, 1997).

To carry out the separation of blood proteins, it is necessary to separate the liquid fraction of the blood –plasma (Harris, 1989)– from the cellular fraction. Most proteins in blood are found in the plasma, except hemoglobin, which is the major protein in the cellular fraction (Gras, 1983). Blood plasma was separated into four different protein fractions using a modification of the Cohn method (Cohn, 1948). This procedure is based on a selective precipitation method using different ethanol concentrations. Fraction 1 (F1) mainly comprises fibrinogen, fraction 2 (F2) mainly γ -globulins, fraction 3 (F3) mostly α - and β -globulins and, finally, fraction 4 (F4) basically contains albumins. This last fraction was the one studied in this paper.

Gels made from albumin solutions were developed to protect food products. Albumin is the main protein of blood plasma. It is a globular protein with a molecular weight of 67 KDa and an isoelectric point of 4.9. Heat treatment was required to prepare these gels and different pH were chosen to simulate the acidity of products such as lemons, plums or some jams (which present a pH of around 2), the neutrality of pork, chicken or fresh fish (pH of around 7) or the basicity of white eggs (pH of around 10).

Different rheological tests provide valuable information about these gels. Temperature sweeps allow us to know at what temperature F4 solutions undergo a phase transition from liquid to gel, flow curves let us to discover the behavior of the samples and creep and recovery tests enable us to understand the internal structure of the gels and the structural variations associated with the introduction of changes in their composition (Dolz, Hernández & Delegido, 2006). To complete the characterization of these gels, rheological results were compared with those obtained from differential scanning calorimetry (DSC), which is a thermoanalytical technique in which the difference in the amount of heat required to increase the temperature of the albumin gel and the reference is measured as a function of temperature. Particle size

measurements and SEM images also constitute techniques that can enable us to improve our knowledge of the microstructure of gels made from F4 solutions.

The aim of this study was the rheological characterization of gels made from albumin solutions in order to evaluate them as possible films for protecting food products. Different rheological tests were carried out with this purpose in mind (temperature sweeps, stress sweeps, flow curves and creep and recovery tests). In addition, differential scanning calorimetry, particle size and scanning electron microscopy (SEM) measurements were also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Plasma

The porcine blood used in this study was obtained from the Junquera Bobes slaughterhouse (Noreña, Asturias, Spain). As the animal was bled, blood was taken and an anticoagulant such as sodium citrate (Panreac) was quickly added at a concentration of 1% w/v. The blood was then centrifuged at 10000xg for 10 minutes in order to separate the plasma (60% in volume) from the cells (40%) in a Kubota 6700 centrifuge employing 250 mL tubes. The plasma thus obtained was kept at 4 °C to avoid bacterial proliferation.

2.2. Fractionation of plasma

Separation of the different fractions from plasma was carried out following a modification of the Cohn method (Moure, Rendueles & Díaz, 2004). Figure 1 shows the process flow diagram. Samples were kept at 0 °C during fractionation. Ethanol was added very slowly, stirring constantly to avoid the precipitation of proteins belonging to the other fractions.

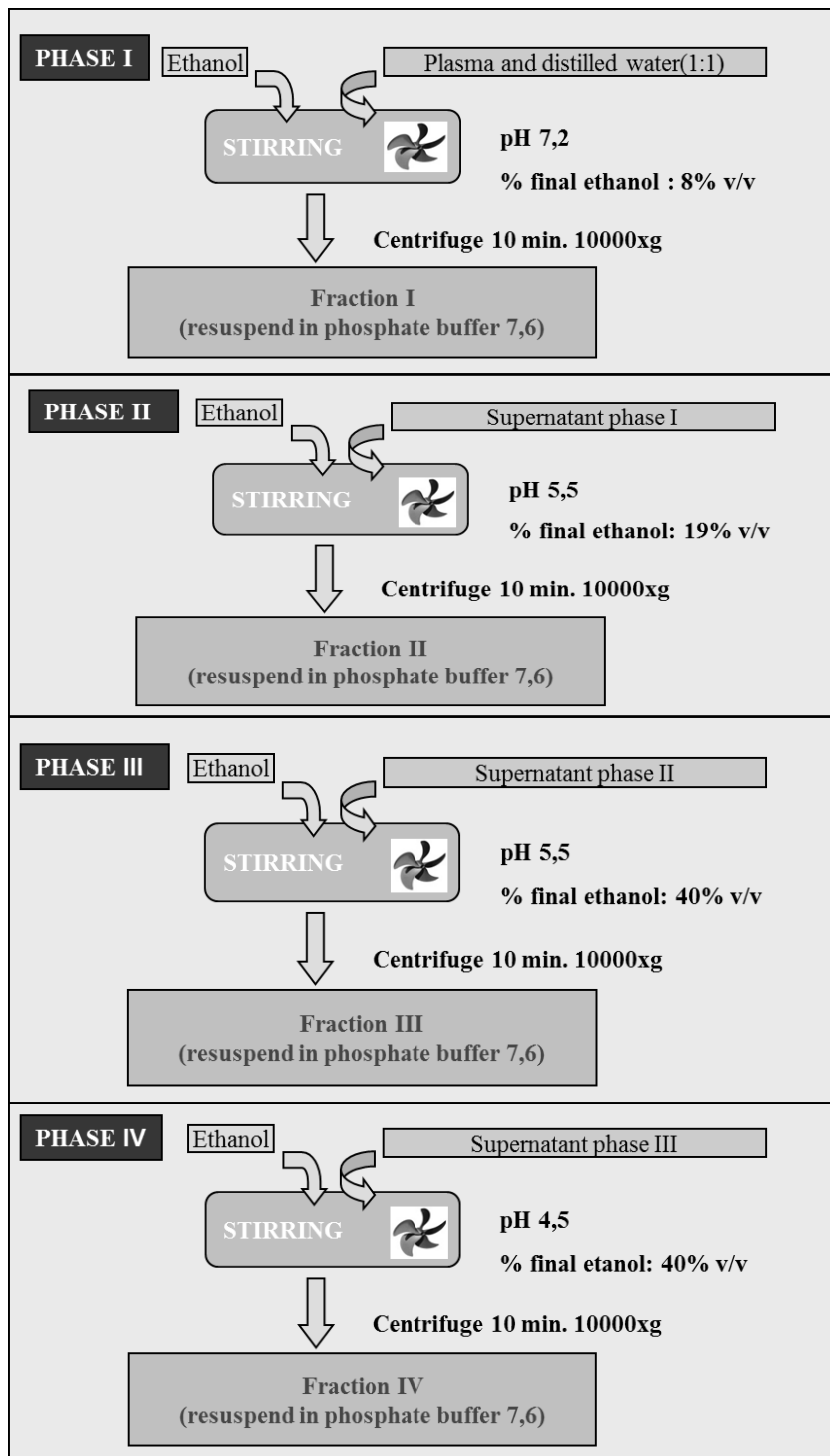


Figure 1. Flow diagram of plasma proteins fractionation.

2.3. Fraction characterization

In order to identify the proteins present in each fraction, a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was carried out. The fractions were diluted 1:25 (v/v) in a dissociation buffer consisting of a 0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.05% bromophenol blue, 35% glycerol, 5% β -mercaptoethanol, 8% (w/v) SDS solution and heated in boiling water

for 5 min. Electrophoresis was carried out on polyacrylamide gels (stacking 3:5% and resolving 12%) with a migration buffer consisting of a 0.02M Tris(hydroxymethyl)aminomethane, glycine 5M, SDS (w/v) 0.1% solution. Proteins were stained following the usual staining procedure (Coomassie blue 0.1%, methanol 50%, acetic acid 10% and water 40%). Gels were destained in a solution containing acetic acid (10%), methanol (40%) and water (50%). Broad Range SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Bio-Rad) were used as proteins standards.

Each fraction obtained was analyzed in order to quantify its protein content following the Lowry method (Lowry, 1951) and the amount of total solids using a Mettler Toledo HR73 moisture analyzer. To carry out the analysis, the four fractions were redissolved in a volume of buffer equal to the starting plasma.

2.4. *Preparation of albumin gels*

Albumin solutions made from F4 were prepared in distilled water to reach a protein concentration of 10% (w/w) and the pH solutions were adjusted to 2, 7 and 10 using either 0.5M HCl or 0.5M NaOH. Albumin solutions were placed on 80 mm diameter glass plates (TDS Pierron), adding approximately 3 g of solution, and were subsequently heated in an incubator (J.P. Selecta 2000209) to 85 ± 1 °C for 45 min. After heat-induced gelation, samples were immediately cooled to 20 ± 1 °C for 15 min and stored at 4 ± 1 °C for 24 hours before being analyzed.

2.5. *Characterization of gels*

2.5.1. *Rheological determinations*

Rheological tests were carried out on a Haake MARS II rotational rheometer equipped with a Peltier unit to control the temperature. To avoid slippage, a serrated plate/plate measuring system (PP35) was used, with a 1 mm gap. All tests (except the temperature tests and flow curves) were carried out at 20 ± 0.1 °C. Before taking any measurements, samples rested for at least 15 min, allowing the stresses induced during sample loading to relax (Laca, Sáenz, Paredes & Díaz, 2009). Glass hoods and silicone oil were used to avoid sample desiccation during the analyses. Samples were analyzed in triplicate.

Steady state flow curves were obtained in Controlled Stress (CS) mode at 6 ± 1 °C from 0 to 50 Pa shear stress. These tests allowed us to classify the different types of fluids. A general

relationship to describe the behavior of non-Newtonian fluids could be the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996):

$$\tau = \tau_0 + k\gamma^n \quad \text{Herschel-Bulkley Law (1)}$$

where τ is the shear stress (Pa), τ_0 the yield point (Pa), γ the shear rate (s^{-1}), k the consistency coefficient ($Pa \cdot s^n$) and n is the flow behavior index (dimensionless). This equation is very convenient because Newtonian fluids, shear-thinning fluids (when $0 < n < 1$), shear-thickening fluids (when $1 < n < \infty$) and Bingham plastic fluids may be considered special cases of the Herschel-Bulkley model (as can be seen in Table 1).

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996)

Fluid	k	n	τ_0
Herschel-Bulkley	>0	$0 < n < \infty$	>0
Newtonian	>0	1	0
Shear-thinning (pseudoplastic)	>0	$0 < n < 1$	0
Shear-thickening (dilatant)	>0	$1 < n < \infty$	0
Bingham plastic	>0	1	>0

Creep and recovery tests were conducted under transient conditions to study the internal structure of the gel. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at 20 ± 1 °C. The recovery tests, also performed at 20 ± 1 °C, lasted 180 seconds. One of the most widely used models that reflects the deformation of a system is the four-parameter Burger model, which represents the association of purely elastic or purely viscous behavior in series (Maxwell model) or in parallel (Kelvin-Voigt model). In the Burger model, the system deformation, called compliance (J), corresponds to the following equation (Steffe, 1996):

$$J = f(t) = J_0 + J_1 \left(1 - \exp\left(\frac{-t}{\lambda_{ret}}\right) \right) + \frac{t}{\mu_0} \quad (2)$$

where J_0 is the instantaneous compliance, J_1 the retarded compliance, λ_{ret} the retardation time (time to achieve maximum strain) and μ_0 is the Newtonian viscosity of the free dashpot. The sum of J_0 and J_1 is called the steady state compliance, J_{0e} , while λ_{ret} represents the ratio μ_0/G_0 , where G_0 is the instantaneous elastic modulus of the Maxwell unit.

Knowing the values of J_{0e} , μ_0 , G_0 and λ_{ret} enables us to compare the structure of the F4 gels, yielding a mechanical model of behavior in response to deformation.

Stress sweeps were performed under dynamic conditions from 0.01 to 500 Pa at a frequency of 1 Hz, thus showing the linear viscoelastic range of the F4 gels. Temperature sweeps allowed us to ascertain the temperature at which F4 solutions undergo a phase transition from liquid to gel. These sweeps were conducted in the previously established linear viscoelasticity range. In both cases, the frequency employed was 1 Hz and the temperature ramps were carried out as follows: temperature was increased (at a heating rate of 0.6 °C/min) from 20 °C to 110 °C, subsequently cooling the samples to 0 °C (0.6 °C/min). The effect of different temperatures (from 0 to 100 °C, at a heating rate of 0.6 °C/min) on the produced gels was then analyzed. These tests were carried out in CS mode at a constant shear stress of 10 Pa. Although experimental detection of the gel point is not easy in practice, Cordobés (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004) suggested that the gel point occurs at the time at which G' (the storage modulus) and G'' (the loss modulus) cross each other at a given frequency (Sánchez & Burgos 1997; Pilosof, 2000). The gel point was determined in this way in the present study.

2.5.2. *Chemical analysis*

The following parameters were analyzed and determined in each sample in triplicate: pH, using a Crison micropH 2001 pHmeter; moisture content, on an HR73 Halogen Moisture Analyzer; protein concentration by means of the Lowry method (Lowry, Rosebrough, Farr & Randall, 1951); and absorbance, using a Shimadzu UV 1203 UV-Vis spectrophotometer at 500 nm.

2.5.3. *Differential scanning calorimetry (DSC) measurements*

Differential scanning calorimetry tests were carried out in hermetically sealed aluminum pans. A DSC 822e (Metler Toledo) apparatus was used, performing temperature ramps from 25 °C to 120 °C at a heating rate of 0.6 °C/min. Subsequently, a second scan from 25 °C to 120 °C was used to check the irreversibility of the reaction changes. The heating rate was approximately the same as that employed in the temperature tests for the reason that the gelling temperature is strongly influenced by the temperature ramp (Donovan, Mapes, Davis & Garibaldi, 1975). As a well pronounced endothermic peak coincides with the moment of coagulation (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004), the gelation temperature (T_g) of the gels made from F4 solutions was determined in this way. Analyses were carried out in duplicate.

2.5.4. Particle size determination

Gels made from albumin solutions were analyzed on a particle size analyzer (Malvern Mastersizer S) following the procedure described by Worrasinchai (Worrasinchai, Suphantharika, Pinjai & Jammong, 2006). Particle size measurements are reported as the volume-weighted mean diameter: $d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$, where n_i is the number of particles of diameter d_i . In addition, there are two relations that allow us to determine the degree of dispersion of particle sizes: D10/D50 and D50/D90, where D50 ($d_{4,3}$) is the average particle diameter value and D90 represents the equivalent diameter where 90 % of the powder particles have a smaller diameter. When the value of these ratios is equal to unity, the distribution is monodisperse, whereas the system can become highly polydisperse when these ratios tend to be small. The gels were stored at refrigerated temperature (4° C). Two different samples of each gel were measured, each sample being measured in triplicate.

2.5.5. Scanning electron microscopy (SEM)

Transversal sections of gels made from F4 solutions were characterized by scanning electron microscopy using a JEOL Deba-6100 electron microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan). All samples, weighing approximately 0.5 g, were submitted to chemical fixation in 0.025 M Phosphate buffer (pH 6.8, Panreac) with 3% v/v glutaraldehyde (Panreac). After 1 hour, the samples were washed twice with the same phosphate buffer for 15 minutes. They were then dehydrated by immersion for 15 minutes in aqueous solutions with increasing concentrations of ethanol: 20, 40, 60, 80 and 100 (twice) % v/v absolute ethanol (Panreac) in water. After that, the samples were transferred to 100% acetone (Panreac) in a similar way (30, 50, 70, 90 and 100 (twice) % v/v acetone in ethanol, 10 minutes each solution) and critical point dried with liquid CO₂ (Balzers CPD 030, BAL-TEC AG, Fürstentum, Liechtenstein). After drying, the samples were mounted on small carbon-tape double-sided aluminum brackets and were bombarded with gold in a vacuum evaporator (Balzers SCD004, (BAL-TEC AG).

2.5.6. Water Holding Capacity (WHC)

WHC measurements were conducted by means of centrifugation tests following the method reported by Kneifel (Kneifel, Paquin, Albert & Richard, 1991). In the present study, 1 g of sample was centrifuged at 20,000xg for 5 min in a Kubota 6700 centrifuge, subsequently weighing the amount of water released. Measurements were carried out in triplicate.

The WHC was determined in terms of the percentage water loss in the samples according to the equation reported by Chantrapornchai & McClements (Chantrapornchai & McClements, 2002):

$$\% \text{ loss} = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

where m_i is the initial mass of the sample and m_f is the mass after centrifugation.

3. Results and discussion

3.1. Fraction characterization

As outlined previously, an SDS-PAGE was carried out in order to identify the four plasma proteins fractions. The electrophoresis bands are shown in Figure 2. Lane 1 in this figure corresponds to fibrinogen (F1), while lane 2 corresponds to fraction 2 (F2), which is represented by several proteins, the majority being γ -globulins. Lane 3 corresponds to fraction 3 (F3), which is quite similar to fraction 2, though in this case the main proteins of this fraction are α - and β -globulins. Lane 4 corresponds to albumin (F4).

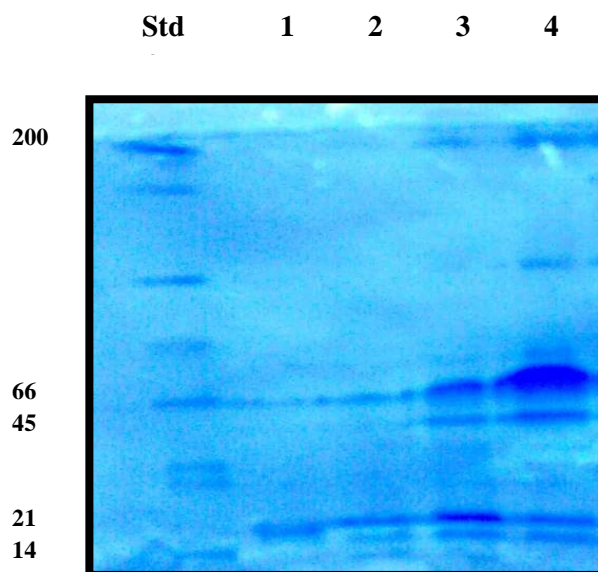


Figure 2. SDS-PAGE of fractions obtained from plasma; lane 1: Fraction 1 (Fibrinogen); lane 2: Fraction 2 (γ -globulins); lane 3: Fraction 3 (α and β -globulins); lane 4: Fraction 4 (seroalbumins).

To complete the characterization, protein quantification and the total solids content of each fraction are shown in Table 2.

Table 2. Protein and total solids content of the albumin plasma fraction (F4)

	Plasma	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4
Protein content (%)	7.35	0.18	2.8	1.6	2.6
Total solids content (%)	8	0.20	3.1	1.8	2.7

Fraction 1 presented the lowest protein content, while fractions 2 and 3 jointly represented more than 60% of this content. The protein content constitutes over 95% of the total solids of each fraction. This high protein content of the solids is due to the previous removal of fat during centrifugation.

3.2. *Characterization of gels made of albumin solutions*

Following the methodology outlined previously, fresh and lyophilized gels made from the F4 solutions were prepared, obtaining good results for all the pH assayed. These gels require characterization to reveal their potential applications.

3.2.1. *Rheological measurements*

Different rheological tests were carried out to optimize the development of these new products, not only as food ingredients or thickeners, but also as films to cover food products. Whatever their final use, their rheological stability is considered an important quality parameter.

A. *Temperature sweeps*

In these tests, the temperature was increased from 20 °C to 110 °C (at a heating rate of 0.6° C/min), subsequently cooling the samples to 20 °C. During gelation, fraction solutions undergo a phase transition from liquid to gel.

The results obtained from the temperature sweeps are given in Figure 3. G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) were determined as functions of temperature at a fixed frequency. Temperature sweeps demonstrated the temperature dependence of a sample's rheological parameters.

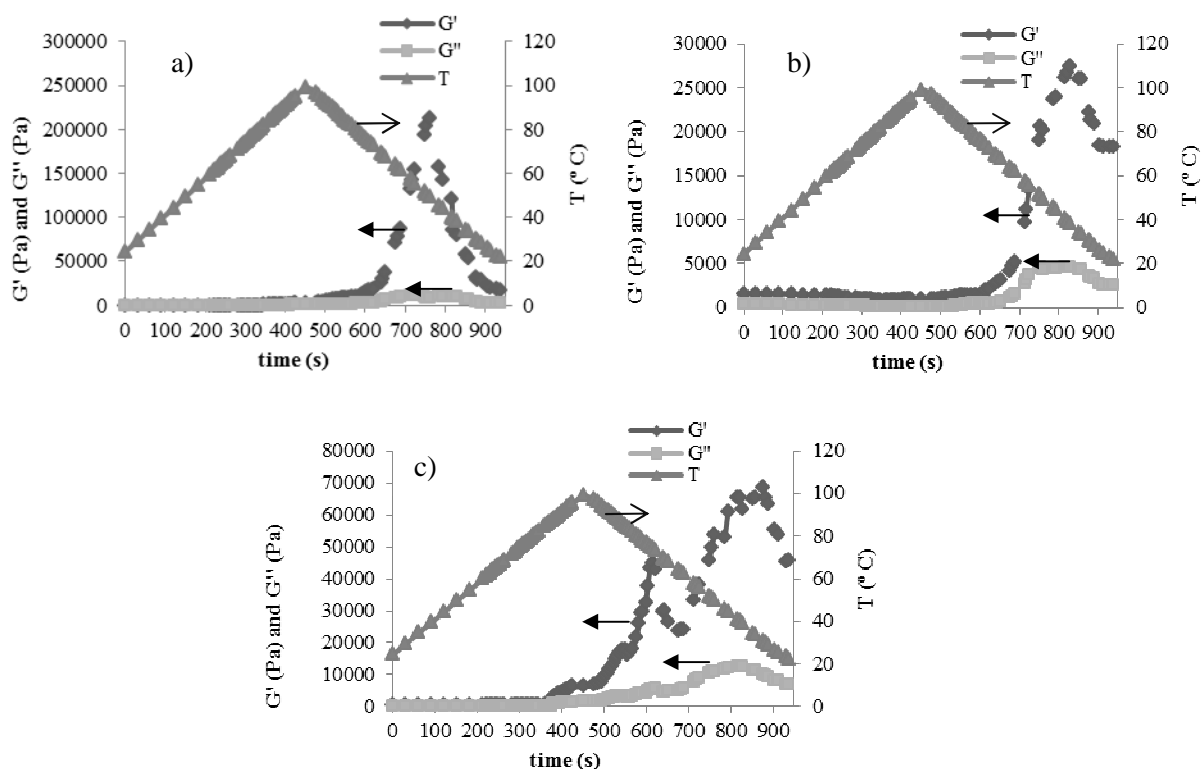


Figure 3. Temperature sweeps of gels made of albumin solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

Results showed that both moduli, G' and G'' , were higher at extreme pH. Gels at pH 2 offered greater resistance to deformation, a very advantageous property as regards their subsequent implementation. However, it should also be noted that all the samples rapidly lose their capacity to reduce temperature, especially gels made from albumin solutions at pH 2.

As outlined previously, the gels were heated and then cooled. During cooling, the storage (G') and loss (G'') moduli were nearly constant until reaching a certain temperature at which G' and G'' rapidly increased indicating transition from a liquid-like state (sol) to a solid-like state (gel). This temperature is usually taken as the gelation temperature and is one of the usual methods for detecting the gelling point in the absence of a crossover between G' and G'' (Lamsal, Jung & Johnson, 2007). Gel points were determined in this way in the present study. As can be seen in Table 3, the gelation point dropped as pH increased.

Table 3. Gelling points of fresh and lyophilized gels made from F4 solutions by means of temperature sweeps

	pH	Gel point (Graphics) (°C)
Gels made from albumin solutions	2	82.45±0.4
	7	64.98±0.8
	10	64.02±1.1

Having studied gel formation, the effect of different temperatures (from 0 °C to 100 °C, at a heating rate of 0.6 °C/min) on the G' and G'' moduli of formed gels was analyzed. These temperatures were chosen to simulate the different situations that these gels might need to support when protecting food products, such as refrigerated temperatures, room temperatures or the high temperatures that may be reached when protecting heat-processed foods. As can be seen in Figure 4, all the gels reached the highest values of G' and G'' at heating temperatures. This fact makes these films very suitable for protecting heat-treated foods.

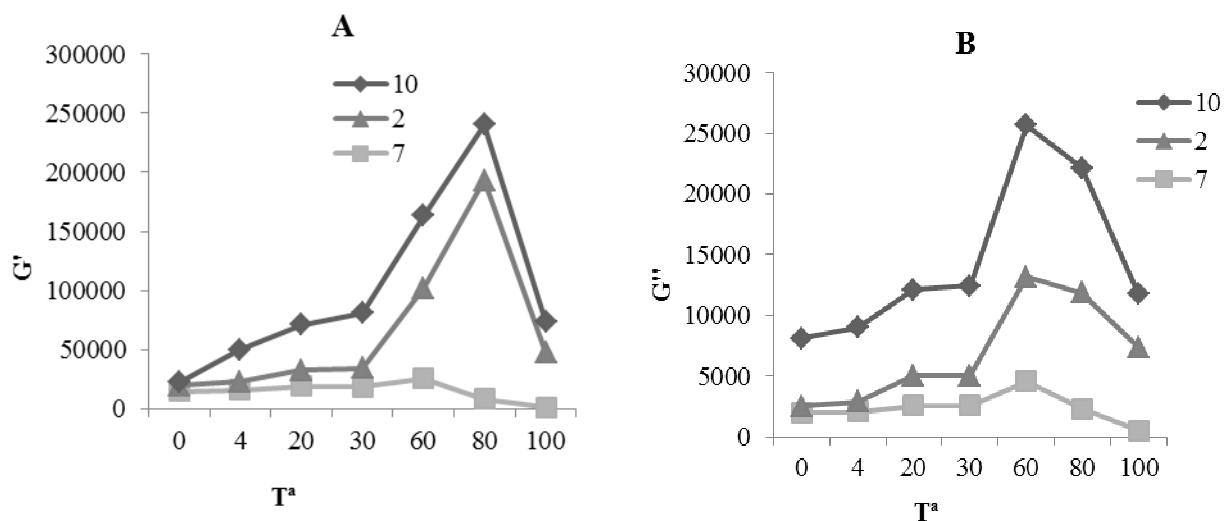


Figure 4. Effect of different temperatures on the G' and G'' moduli of formed gels. G' of gels made of F4 solutions (A) and G'' of gels made of F4 solutions (B).

B. Flow curves

Flow curves were performed in CS mode at 6 ± 1 °C from 0 to 50 Pa shear stress. Data obtained from the flow curves were fitted to Equation 1. The characteristics values of n and k are shown in Table 4. All data display a good correlation with Equation 1 ($R^2 = 0.99$).

Table 4. Values of the behavior index (n) and consistency index (k) of gels made from albumin solutions at different pH. Average values \pm SD are reported

	pH	n (dimensionless)	k (Pa.sn)	Fluid
Gels made from albumin solutions	2	1.020 \pm 0.1	6.049e-04 \pm 0.0008	Shear-thickening (dilatant)
	7	5.527e-02 \pm 0.004	3.671e+03 \pm 105	Shear-thinning (pseudoplastic)
	10	2.469e-01 \pm 0.09	3.476e+03 \pm 224	Shear-thinning (pseudoplastic)

As stated by Steffe (Steffe, 1996), values of n and k allow us to classify the different types of fluids. These values indicate that gels produced at pH 2 behaved in a dilatant (shear-thickening) manner, while gels synthesized at higher pH behaved pseudoplastically (shear-thinning). Dilatant responses are unusual in food products because their apparent viscosity increases with increasing shear stress. In this particular case, the behavior could be due to the acid coagulation that samples suffer at pH 2.

C. Creep and recovery tests

Creep and recovery tests enable us to understand the internal structure of gels and the structural variations associated with the introduction of changes in their composition. In the creep tests, an instantaneous stress of 40 Pa was applied to the sample for 60 seconds at 20 \pm 1° C. The recovery tests, also performed at 20 \pm 1° C, lasted 180 seconds.

The fitting of $J = f(t)$, based on the Burger model (Equation 2), yielded values of $r^2 \geq 0.99$ in all cases. The values of J_{0e} , μ_0 , G_0 and λ_{ret} are reported in Table 5.

Table 5. Values of the parameters of the Burger model for all the gels studied

	pH	J_{0e} (1/Pa)	μ_0 (Pa)	G_0 (Pa)	λ_{ret} (s)	r^2
Gels made from albumin solutions	2	2.077e-03 \pm 0.0002	7.166e+05 \pm 241	4.814e+02 \pm 2	148.8e+01 \pm 21	0.994
	7	9.456e-05 \pm 0.00005	3.549e+06 \pm 851	1.058e+07 \pm 536	335.6 \pm 3	0.997
	10	8.003e-05 \pm 0.00003	2.187e+05 \pm 250	1.249e+04 \pm 15	175.1e-01 \pm 0.9	0.998

All the samples showed a viscoelastic response, in view of the fact that they all exhibited a nonlinear response to strain. Furthermore, due to their ability to recover some structure by

storing energy, they showed a permanent deformation lower than the total deformation applied to them (Steffe, 1996). Gels made from albumin solutions at neutral pH exhibited the greatest resistance to deformation, given that the values of the parameters (μ_0 and G_0) of these gels exceeded those of all the rest.

The system reached maximum deformation 60 seconds after of the application of stress for said period of time. The stress was then removed. This allowed us to calculate the percentage of elastic recovery, which is shown in Table 6. Once again, gels made from F4 solutions at pH 7 showed the best results.

Table 6. Elastic recovery percentage of gels made from albumin solutions at different pH

	pH	% Elastic recovery
Gels made from albumin solutions	2	45.23±1.1
	7	71.45±1.1
	10	13.84±0.9

3.2.2. Thermal properties

DSC is a widely used technique for studying thermal transitions of food proteins as it provides information on the conversion from the native to the heat-denatured state. This conversion is a phenomenon that is accompanied by a significant uptake of heat that gives rise to an endothermic peak in the DSC thermogram (Cordobés, Partal & Guerrero, 2004).

The transition temperatures of fresh gels made from F4 solutions were: 86.45±0.7 °C for gels at pH 2, 64.58±0.3 °C for gels at pH 7 and 61.43±0.5 °C for gels at pH 10. Comparing these results with those obtained from temperature sweeps (82.45±0.4 °C at pH 2, 64.98±0.8 °C at pH 7 and 64.02±1.1 °C at pH 10), it may be concluded that the gelation point increased as pH decreased. Gels made from albumin solutions at pH 2 were found to be the most resistant to heat denaturation and subsequent aggregation.

3.2.3. Particle size

In order to determine how gel particle size is affected by pH, gels made from albumin solutions at pH 2, 7 and 10 were studied. Figure 5 shows the size distribution curves of the different gels.

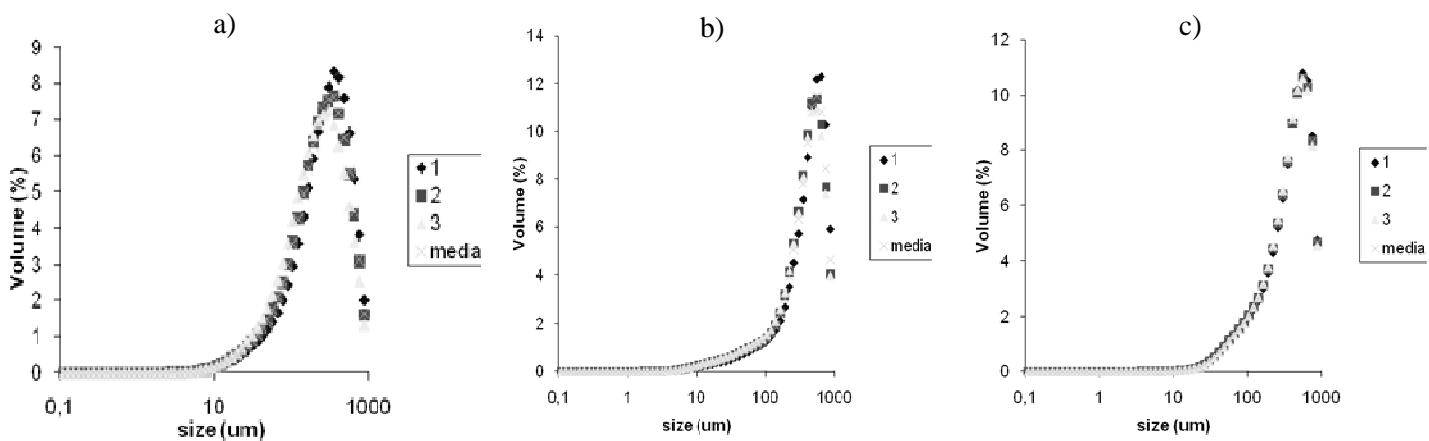


Figure 5. Size distribution curves for gels made of F4 solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

All the gels made from F4 solutions displayed unimodal curves. As can be seen in Table 7, an increase in average particle diameter $d_{4,3}$ was observed at neutral pH (a fact that can be corroborated by SEM images). The D50/90 ratio thus showed that gels produced at low and high pH were more polydisperse than those synthesized at pH 7. The D10/50 ratio did not reveal significant differences.

Table 7. Particle size ($d_{4,3}$, D50/90 and D10/50) from fresh gels made of F4 solutions at pH studied. Average values \pm SD are reported

	pH	$d_{4,3}$ (μm)	D50/D90	D10/D50
Gels made from albumin solutions	2	267.42 \pm 6	0.41 \pm 0.02	0.25 \pm 0.01
	7	387.72 \pm 5	0.56 \pm 0.04	0.21 \pm 0.01
	10	381.37 \pm 5	0.54 \pm 0.02	0.25 \pm 0.01

3.2.4. Microstructure

Figure 6 shows the SEM images of gels made from albumin solutions at pH 2, 7 and 10. Important differences in microstructure were found depending on pH. In these images, gray areas represent protein aggregates, while black spaces show the pores of the network that contain the aqueous phase (Salvador, Toldrá, Saguer, Carretero & Parés, 2008).

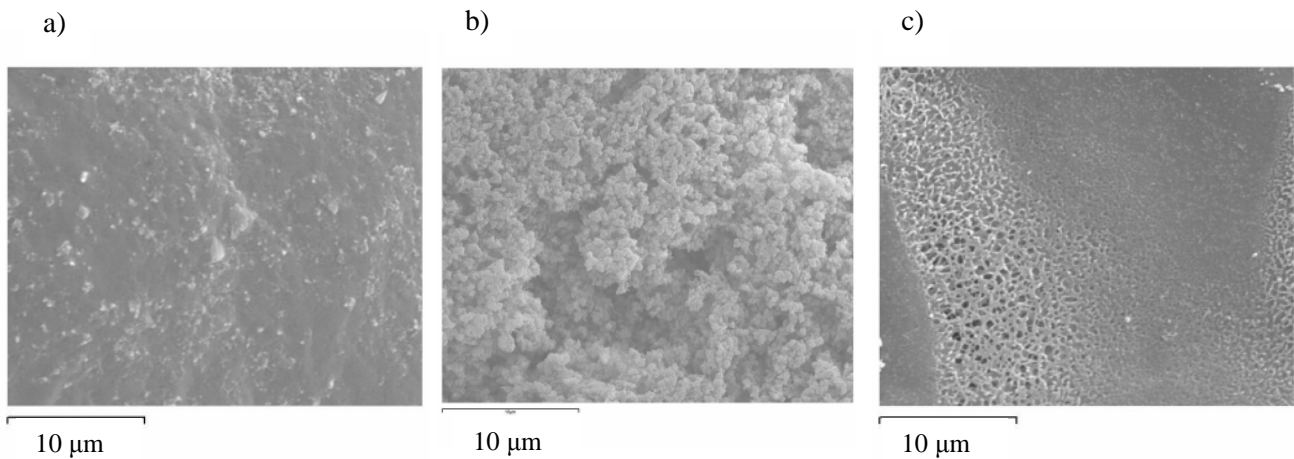


Figure 6. SEM micrographs of gels made of F4 solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).

At pH 2, gels made from F4 solutions formed a fine network of compact homogeneous chains composed of tiny particles. However, gels produced at pH 7 and 10 were composed of protein aggregates interspersed with cavities, the particle size being higher at neutral pH. This behavior could be due to the acid coagulation that affected gels at pH 2.

3.2.5. *Water holding capacity*

These gels have been developed as films to protect food products, so their water holding capacity (WHC) is one of the most important quality parameters to achieve. The results obtained were fitted to Equation (3).

Gels made from F4 solutions presented a moisture content of $89.75 \pm 4\%$. The percentage loss in WHC was quite high at day 1 ($8.84 \pm 0.9\%$), but decreased to $0.19 \pm 0.05\%$ at day 30. This fact makes gels made from F4 solutions suitable for protecting food products that need a high moisture content and low water loss, such as meat or dairy products.

4. *Conclusions*

Results showed that gels made from porcine albumins (Cohn Fraction 4) could be used as thickeners and even as films to protect food products. Gels synthesized at neutral pH were found to be very suitable to protect heat-treated foods, as all the gels reached the highest values of G' and G'' at heating temperatures. Gels produced at pH 2 exhibited dilatant (shear-

thickening) behavior, while those produced at higher pH behaved pseudoplastically (shear-thinning). All the samples showed a viscoelastic response, which was very favorable for forming films to cover foodstuffs. However, gels produced at neutral pH exhibited the greatest resistance to deformation. Size distribution measurements displayed unimodal curves for all the samples, while SEM images revealed that gels made from F4 solutions at pH 2 formed a fine network of compact homogeneous chains composed of tiny particles. However, gels synthesized at pH 7 and 10 were composed of protein aggregates interspersed with cavities, the particle size higher being at neutral pH. Gels made from F4 solutions presented a high moisture content and good WHC, which makes them suitable for protecting food products that need a high moisture content and low water loss. The gels made from albumins showed good properties for their use in many applications in the food industry. They could be used as thickeners due to their good gelling abilities and may be especially useful for covering food products. This could be possible thanks to their good resistance to deformation, elastic behavior and good WHC.

5. References

- Chantrapornchai, W., McClements, D.J. (2002). Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels. *Food Hydrocolloids*, 16 (5), 467-476.
- Cohn, E.J. *The history of plasma fractionation*. In *Advances in Military Medicine*, Andrus et al. Eds. Little, Brown & Co, 1948.
- Cordobés, F., Partal, P. & Guerrero, A. (2004). Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels. *Rheological Acta*, 43, 184-195.
- Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, 78, 522-528.
- Dolz, M., Hernández, M. J. & Delegido, J. (2006). Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions. *Food Hydrocolloids*, 22, 421-247.
- Donovan, J.M., Mapes, C.J. Davis, J.G. & Garibaldi, J.A. (1975). A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 73-83.
- Gras, J. (1983). *Plasma proteins*. Barcelona, Spain: Lims.
- Harris, E. R. V. (1989). *Protein purification methods: A practical approach*. Oxford, UK: Oxford University.

- Kneifel, W., Paquin, P., Albert, T., Richard, J.P. & (1991). Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects-a review. *Journal of Dairy Science*, 74(7), 2027-2041.
- Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., & Díaz, M. (2009). Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *Journal of Food Engineering*, 97, 243-252.
- Lamsal, B.P., Jung, S., & Johnson, L.A. (2007). Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Moure, F., Rendueles, M. & Díaz, M. “Plasma protein fractionation by ion exchange chromatography”. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 27 (1), 17-24, 2004.
- Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J., & Carretero, C. (1998). Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influence by pH. *Journal of Food Science*, 63(6), 958-961.
- Pilosof AMR. (2000). Bartholomai GB (eds). Caracterización funcional y estructural de proteínas. Eudeba, Buenos Aires, pp 75–95.
- Saguer, E., Fort, N., Álvares, P. A., Sedman J., & Ismail, A. (2008). Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis. *Food Hydrocolloids* 22(3), 459-467.
- Salvador, P., Toldrá, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2008). Microstructure-function relationships of heat induced gels of porcine haemoglobin. *Food Hydrocolloids*, 23, 1654-1659.
- Sánchez, C., Burgos, J. (1997). Gelation of sunflower globulin hydrolysates: rheological and calorimetric studies. *J Agric. Food Chem.*, 45, 2407–2412.
- Silva, V., & Silvestre, M. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36(7), 709-718.
- Steffe, J. F. (1996). *Rheological methods in food process engineering*. USA: FreemanPress.
- Oshodi, A. & Ojokan, E. (1997). Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate. *Food Chemistry* 59, 333-338.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., & Jammong, P. (2006). β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydrocolloids*, 20(1), 68-78.

CONCLUSIONES

1. Los resultados de la desmineralización del plasma sanguíneo por intercambio iónico (catiónico y aniónico), muestran una buena capacidad de retención de la resina Lewatit S100 para los principales cationes y de las resinas Lewatit MP-62 y MP-500 para los principales aniones del plasma. Sin embargo, se ha visto que se produce una importante pérdida de proteínas durante el proceso así como la variación del pH a la salida de la columna, lo que puede producir importantes cambios en la configuración de las proteínas.
2. La ultrafiltración, utilizando una membrana con un tamaño de poro de 10 KDa, ha permitido una buena eliminación de la mayor parte de los iones del plasma, con una baja pérdida de proteína y sin variaciones importantes de pH. El principal problema de esta técnica es la elevada cantidad de efluentes generados y la elevada DQO de los mismos.
3. Las operaciones con membranas podrían ser más adecuadas para tratar grandes volúmenes de plasma, es decir, a escala industrial, mientras que el proceso de intercambio iónico sería más apropiado cuando se pretenda lograr una desmineralización exhaustiva. El tratamiento de intercambio iónico produce un mayor grado de desnaturalización de las proteínas que el de ultrafiltración. La eliminación de cationes durante los tratamientos en columna rompe el equilibrio de iones, mientras que con membranas se permite mantener el equilibrio al eliminar todos los iones. Además el proceso de intercambio iónico produce un acusado descenso del pH, lo que provoca en las proteínas fuertes repulsiones electrostáticas.
4. La desnaturalización de las proteínas procesadas afecta a alguna de sus propiedades biológicas. Así se ha estudiado la reducción de la actividad enzimática y la capacidad de renaturalización, obteniéndose eficacias de renaturalización entorno al 40 % de la capacidad natural de la enzima ensayada. Se ha determinado la importancia que la agitación tiene en el proceso.
5. Los tres productos estudiados: plasma sin tratar, descationizado y desionizado, presentan buenas propiedades funcionales no existiendo grandes diferencias entre el tratamiento de desmineralización utilizado. El proceso de intercambio iónico afecta positivamente a la capacidad emulsificante y a la formación de espuma, la ultrafiltración ejerce una buena influencia en la solubilidad, capacidad emulsificante y tensión superficial.

6. El plasma descationizado y el desionizado pueden añadirse a diferentes productos alimentarios tales como productos cárnicos, productos lácteos, helados, soufflés y pan. Del mismo modo, gracias a su buena solubilidad el plasma sin tratar puede ser añadido a productos lácteos, bebidas y pan, sin pérdida de propiedades funcionales.
7. El aprovechamiento de las propiedades gelificantes de las diferentes fracciones sanguíneas ha permitido la elaboración de geles, obteniéndose, en general, buenos resultados. Se ha evaluado la posibilidad de usar dichos productos como espesantes o como películas para proteger los alimentos, resultando aptos para dicho cometido.
8. Los geles sintetizados con la principal proteína de la fracción celular, la hemoglobina, han resultado ser los más resistentes y elásticos. Además se trata de geles que presentan un comportamiento pseudoplástico, lo cual es muy ventajoso para su posterior aplicación. Son geles que presentan una baja capacidad de retención de agua por lo que podrían ser especialmente útiles para proteger productos con un bajo contenido en humedad.
9. Los geles elaborados con globina decolorada también han presentado una excelente resistencia, además de obtener los mejores resultados de recuperación elástica. Se trata de geles que, a diferencia del resto de geles sintetizados, mostraron una apariencia mucho más deseable para el consumidor. Además han presentado un alto contenido en humedad y una capacidad de retención de agua del 100%, lo que los convierte en muy adecuados para proteger productos como las pastas cárnicas finas.
10. Los geles sintetizados con la fracción plasmática al completo han presentado una buena resistencia y elasticidad. Presentaron un comportamiento pseudoplástico y, en general, mostraron una baja capacidad de retención de agua.
11. De entre los geles elaborados con las fracciones plasmáticas cabe destacar la excelente resistencia a la deformación presentada por los geles hechos con la fracción 3 (α y β -globulinas), que además mostraron a muchos de los pH estudiados un comportamiento pseudoplástico. Por su parte los geles elaborados con la fracción 1 (fibrinógeno) y la fracción 4 (albúminas) también presentaron una excelente resistencia y elasticidad y, debido a su baja capacidad de retención de agua, son especialmente aptos para recubrir productos de panadería.

12. Se han demostrado, por tanto, los usos potenciales que nos ofrecen las proteínas que contiene la sangre animal. Pueden adicionarse como aditivos a multitud de productos alimenticios, para lo cual deben desmineralizarse previamente, o pueden constituir la base para la síntesis de nuevos materiales con los que recubrir alimentos.

APÉNDICES

I. LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Fig. 1. Esquema del fraccionamiento de la sangre.....	8
Fig. 2. Esquema del proceso de desnaturalización de una proteína.....	22
Fig. 3. Esquema del proceso de renaturalización (refolding).....	24
Fig. 4. Tipos de fluidos en función de su comportamiento reológico.....	35

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Fig. 5. Esquema de la obtención de los componentes de la sangre.....	42
Fig. 6. Diagrama de flujo del fraccionamiento de las proteínas plasmáticas.....	43
Fig. 7. Diagrama de flujo de la obtención de globina decolorada.....	45
Fig. 8. Columna de vidrio de borosilicato cargada con resina catiónica Lewatit S-100 preparada para la fase de elución.....	48
Fig. 9. Equipo de ultrafiltración Labscale TFF System.....	50
Fig. 10. Analizador halógeno de humedad Mettler Toledo HR73.....	59
Fig. 11. Reómetro rotacional Haake MARS II.....	61

CAPÍTULO 3. DESMINERALIZACIÓN DE PLASMA

3.1. Demineralization by ion exchange of slaughterhouse porcine blood plasma

Fig. 1. Na ⁺ concentration with time in Lewatit S-100 resin.....	72
Fig. 2. Experimental breakthrough curve for Na ⁺ and K ⁺ cations in Lewatit S-100 resin.....	73
Fig. 3. Evolution of pH and protein concentration with time along the charge	

operation with the cationic column.....	74
Fig. 4. Concentration of Na ⁺ , K ⁺ and Ca ²⁺ in the elution step for the cationic column.....	75
Fig. 5. Evolution of chloride and sulfate concentration with time in batch experiments with the Lewatit MP-500 resin.....	76
Fig. 6. Experimental breakthrough curves of anions phosphate and sulfate in the anionic column (Lewatit MP-62 resin).....	78
Fig. 7. pH and protein concentration evolution with time for the anionic column (Lewatit MP-62 resin).....	79
Fig. 8. Elution curves for sulfate, phosphate and chloride in the anionic column (Lewatit MP-500 resin).....	80

3.2. Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration

Fig. 1. Demineralization procedure using ion exchange (a) and ultrafiltration (b)....	84
Fig. 2. Na ⁺ concentration versus time in Lewatit S-100.....	86
Fig. 3. Sulphate and Chloride concentration versus time for Lewatit MP-500 resin..	87
Fig. 4. Breakthrough curve for Chlorides using Lewatit MP-500 resin.....	88
Fig. 5. Concentration of Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ and SO ₄ ²⁻ versus VCF.	88
Fig. 6. Protein concentration and pH evolution in the retentate versus VCF.....	88
Fig. 7. Chlorides and sulphates concentration in the permeate during ultrafiltration.	89

CAPÍTULO 4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DESMINERALIZADAS

4.1. Determinación por viscosimetría de la desnaturalización de proteínas sometidas a operaciones de desmineralización

Fig. 1. Esquema del proceso de desnaturalización de una proteína.....	95
Fig. 2. Variación de la concentración de los iones mayoritarios del plasma sanguíneo en el tiempo utilizando resinas de intercambio iónico. (a) Variación de sodio en el tiempo usando una resina Lewatit S-100. (b) Variación de cloruros y sulfatos en el tiempo usando una resina Lewatit MP-500.....	101
Fig. 3 Variación de la concentración de los principales iones del plasma sanguíneo frente a VCF utilizando una técnica de ultrafiltración.....	102
Fig 4. Pérdida de proteínas y variación del pH durante el tratamiento de ultrafiltración.....	103
Fig. 5. Variación de la viscosidad de muestras de plasma sanguíneo sometidas a distintos procesos de desmineralización.....	104
Fig. 6. Variación de la viscosidad de muestras de lactosuero sometidas a distintos procesos de desmineralización.....	105

4.2. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma

Fig. 1. Breakthrough curve for sodium and potassium using Lewatit S-100 resin....	110
Fig. 2. Concentration of Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ and SO ₄ ²⁻ versus VCF.....	110
Fig. 3. Effect of pH on solubility of standard, decationed and deionized plasma.....	111
Fig. 4. Emulsifying capacity of standard, decationed and deionized plasma.....	111
Fig. 5. Effect of pH on foam capacity of standard, decationed and deionized plasma.....	111
Fig. 6. Effect of pH and foam stability of standard (a), decationed (b) and deionized plasma (c).....	112
Fig. 7. Interfacial tension of standard, decationed and deionized plasma.....	113

4.3. Desnaturalización y renaturalización de proteínas procedentes de residuos alimenticios...

Fig. 1. Esquema del proceso de renaturalización (refolding).....	117
Fig. 2. Diagrama del proceso de renaturalización de lisozima.	119
Fig. 3. Esquema del proceso de renaturalización.	120
Fig. 4. Curva de calibrado de <i>Micrococcus lysodeikticus</i> .	121
Fig. 5. Renaturalización de lisozima por dilución.	122
Fig. 6. Comparativa de los procesos de refolding llevados a cabo con y sin agitación.....	123
Fig.7. Evolución del proceso de renaturalización con el tiempo.....	123

CAPÍTULO 5. SÍNTESIS DE MATERIALES A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN CELULAR

5.1. Rheological characterization of heat induced gels of porcine haemoglobin

Fig. 1. Temperature sweeps of Hb gels made of fresh and lyophilized solutions at pH 2, 7 and 10.....	134
Fig. 2. Effect of different temperatures on the G' and G'' moduli of formed gels. G' of fresh Hb gels (A), G'' of fresh Hb gels (B), G' of lyophilized Hb gels (C) and G'' of lyophilized Hb gels (D).	136
Fig. 3. Stress sweeps of Hb gels made of fresh and lyophilized solutions at pH 2, 7 and 10.....	137
Fig. 4. Creep and recovery curves of Hb gel made of fresh and lyophilized solutions at pH 2, 7 and 10.....	140
Fig. 5. Size distribution curves for fresh Hb gels made of fresh solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	141
Fig. 8. SEM micrographs of fresh Hb gels made of fresh solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	142

5.2. Decolorized porcine globin gels produced by heat-induced gelation. Physical and rheological

Figure 1. Decolorized globin production process.....	150
Figure 2. Appearance of a decolorized globin gel.....	155
Figure 3. Temperature sweeps of decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10(c).....	156
Figure 4. Effect of different temperatures on the G' (A) and G'' (B) moduli of formed gels.....	157
Figure 5. Stress sweeps of decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	158
Figure 6. DSC analysis of decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	161
Figure 7. Size distribution curves for decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	162
Figure 8. SEM micrographs of decolorized globin gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).	163

CAPÍTULO 6. SÍNTESIS DE MATERIALES A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN PLASMÁTICA

6.1. Geles sintetizados a partir del plasma

6.1.1. Rheological characterization and thermal behavior of porcine blood plasma protein gels

Figure 1. Temperature sweeps of fresh and lyophilized plasma gels at pH 2, 7 and 10.....	176
Figure 2. Effect of different temperatures on the G' and G'' moduli of formed gels. G' of fresh plasma gels (A), G'' of fresh plasma gels (B), G' of lyophilized plasma gels (C), G'' of lyophilized plasma gels (D).....	178
Figure 3. Stress sweeps of fresh and lyophilized plasma gels at pH 2, 7 and 10.....	179
Figure 4. Size distribution curves for fresh plasma gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	182
Figure 5. SEM micrographs of fresh plasma gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	183
Figure 6. Appearance of a plasma gel.....	185

6.1.2. Caracterización reológica de los geles de plasma sintetizados con glicerol

Fig. 1. Efecto de diferentes temperaturas sobre los módulos G' y G'' de geles de plasma sintetizados con diferentes concentraciones de glicerol a pH 2. G' (A) y G'' (B).....	194
Fig. 2. Curvas de distribución de tamaños de las partículas de geles de plasma sintetizados con una concentración de glicerol de 50g /100g de proteína.....	196
Fig. 3. Micrografía electrónica de barrido de un gel de plasma sintetizado con una concentración de glicerol de 50 g/100 g de proteína a pH 2.....	197

6.2. Geles sintetizados a partir de las fracciones del plasma

6.2.1. Caracterización reológica de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas de plasma

porcino.....	
Fig. 1. Diagrama de flujo del fraccionamiento de las proteínas plasmáticas.....	204
Fig. 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las diferentes fracciones plasmáticas. Calle 1: Fracción 1 (Fibrinogeno); calle 2: Fracción 2 (γ -globulinas); calle 3: Fracción 3 (α and β -globulinas); calle 4: Fracción 4 (seroalbuminas).....	210
Fig. 3. Barridos de temperatura de las soluciones de fibrinógeno liofilizadas a pH 7 (a) y 10 (b).....	211
Fig. 4. Barridos de temperatura de las soluciones de γ -globulinas frescas a pH 7 (a), liofilizadas a pH 7 (b) y liofilizadas a pH 10 (c).....	212
Fig. 5. Efecto de diferentes temperaturas sobre los módulos G' y G'' de geles de fibrinógeno y γ -globulinas. G' de geles de la F1 (A), G'' de geles de la F1 (B), G' de geles de la F2 (C) y G'' de geles de la F2 (D).....	214
Fig. 6. Calorimetría diferencial de barrido de geles de fibrinógeno (a) y γ -globulinas (b) sintetizados a pH neutro a partir de soluciones liofilizadas.....	218
Fig. 7. Curvas de distribución del tamaño de las partículas de geles de fibrinógeno (a) y γ -globulinas (b) sintetizados a pH neutro a partir de soluciones liofilizadas.....	219
Figure 8. Micrografías electrónicas de barrido de geles de fibrinógeno (a) y γ -globulinas (b) sintetizados a pH neutro a partir de soluciones liofilizadas.....	220

6.2.2. Rheological characterization of thermal gels of α and β -globulins from porcine

blood plasma

Fig. 1. Flow diagram of plasma proteins fractionation.....	228
Fig. 2. SDS-PAGE of fractions obtained from plasma; lane 1: Fraction 1 (Fibrinogen); lane 2: Fraction 2 (γ -globulins); lane 3: Fraction 3 (α and β - globulins); lane 4: Fraction 4 (seroalbumins).....	234
Fig. 3. Temperature sweeps of gels made of fresh and lyophilized solutions at pH 2, 7 and 10.....	235
Fig. 4. Effect of different temperatures on the G' and G'' moduli of formed gels. G' of gels made of fresh solutions (A), G'' of gels made of fresh solutions (B), G' of gels made of lyophilized solutions (C), G'' of gels made of lyophilized solutions (D).....	237
Fig. 5. Size distribution curves for F3 gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	240
Fig. 6. SEM micrographs of F3 gels at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	241

6.2.3. Rheological characterization of thermal gels of porcine blood plasma albumins.

Fig. 1. Flow diagram of plasma proteins fractionation.....	249
Fig. 2. SDS-PAGE of fractions obtained from plasma; lane 1: Fraction 1 (Fibrinogen); lane 2: Fraction 2 (γ -globulins); lane 3: Fraction 3 (α and β - globulins); lane 4: Fraction 4 (seroalbumins).....	254
Fig. 3. Temperature sweeps of gels made of albumin solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	256
Fig. 4. Effect of different temperatures on the G' and G'' moduli of formed gels. G' of gels made of F4 solutions (A) and G'' of gels made of F4 solutions (B).....	257
Fig. 5. Size distribution curves for gels made of F4 solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).....	260
Fig. 6. SEM micrographs of gels made of F4 solutions at pH 2 (a), 7 (b) and 10 (c).	261

II. LISTA DE TABLAS

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Tabla 1. Porcentaje de los componentes de la sangre.....	6
Tabla 2. Cantidad de sangre obtenida de los distintos animales de sacrificio.....	7
Tabla 3. Composición de cationes del plasma sanguíneo.....	10
Tabla 4. Composición de aniones del plasma sanguíneo.....	10
Tabla 5. Composición de derivados proteicos del plasma sanguíneo.....	11
Tabla 6. Composición de glúcidos y derivados metabólicos del plasma sanguíneo...	11
Tabla 7. Composición de otras sustancias del plasma sanguíneo.....	12
Tabla 8. Composición química del plasma bovino.....	12
Tabla 9. Porcentaje de las distintas fracciones proteicas del plasma bovino.....	13
Tabla 10. Parámetros de los distintos procesos de filtración.....	18
Tabla 11. Propiedades funcionales que intervienen en diversos alimentos.....	32

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 12. Características de las resinas (a) Lewatit S-100, (b) Lewatit MP-62 y (c) Lewatit MP-500.....	47
Tabla 13. Especificaciones para el dispositivo Pellicon XL.....	51
Tabla 14. Parámetros instrumentales de los cationes determinados.....	58
Tabla 15. Fluidos Newtoniano, dilatante, pseudoplástico y plástico Bingham como casos especiales del modelo Herschel-Bulkle (Steffe, 1996).....	62

CAPÍTULO 3. DESMINERALIZACIÓN DE PLASMA

3.1. Demineralization by ion exchange of slaughterhouse porcine blood plasma

Table 1. Characteristics of the resins (A) Lewatit S-100, (B) Lewatit MP-62 and (C) Lewatit MP-500.....	70
Table 2. Physicochemical characteristics of the plasma.....	71
Table 3. Average experimental results for the cation exchange.....	73
Table 4. Average results of the cation exchange load at 2.9 bed volumes (bv).....	75
Table 5. Average retention capacities for Cl^- and SO_4^{2-} of blood plasma in batch experiments for Lewatit MP-62 and Lewatit MP-500.....	77
Table 6. Average experimental parameters for anion exchange using the Lewatit MP-62 and the Lewatit MP-500 resins.....	78
Table 7. Average results of demineralization by anion exchange at 0.48 bed volumes (bv).....	80

3.2. Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration

Table 1. Characteristics of the (a) Lewatit S-100, (b) Lewatit MP-62 and (c) Lewatit MP-500 resins.....	85
Table 2. Specification for the Pellicon XL Device.....	86
Table 3. Characterization of blood and plasma ($T = 20\text{ }^\circ\text{C}$).....	86
Table 4. Concentration of the major anions and cations in plasma.....	87
Table 5. Experimental parameters of cation exchange.....	87
Table 6. Comparison of ion concentration, protein content and pH between raw and ultrafiltrated plasma (using $\text{VCF} = 4$).....	88

CAPÍTULO 4. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS DESMINERALIZADAS

4.1. Determinación por viscosimetría de la desnaturalización de proteínas sometidas a operaciones de desmineralización

Tabla 1. Composición mineral del plasma sanguíneo.....	98
--	----

Tabla 2. Composición mineral del lactosuero.....	98
Tabla 3. Comparación de la concentración de iones, del contenido proteico y del pH entre plasma sin tratar y plasma ultrafiltrado (usando VCF =4).....	103
Tabla 4. Pérdida de proteínas y variación del pH durante el tratamiento de intercambio iónico.....	104
Tabla 5. Valores de pH de muestras sometidas a distintos procesos de desmineralización.....	107

4.2. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma

Table 1. Characteristics of the Lewatit S-100 resin	110
Table 2. Applications of different types of plasma in different foods according functional properties	115

CAPÍTULO 5. SÍNTESIS DE MATERIALES A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN CELULAR

5.1. Rheological characterization of heat induced gels of porcine haemoglobin

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model	130
Table 2. Gelling points of fresh and lyophilized Hb gels by means of temperature sweeps	135
Table 3. Values of the behaviour index (n) and consistency index (k) of fresh and lyophilized gels at different ph. Average values \pm SD are reported	138
Table 4. Values of the parameters of the Burger model for all the gels studied	139
Table 5. Percentage elastic recovery of fresh and lyophilized gels at different pH	140
Table 6. Particle size (d4,3, D50/90 and D10/50) of fresh Hb gels at the studied pH. Average values \pm SD are reported	142
Table 7. Humidity and WHC (% Loss) for fresh Hb gels at pH 2, 7 and 7. Average values \pm SD are reported	143

5.2. Decolorized porcine globin gels produced by heat-induced gelation. Physical and rheological

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model	151
Table 2. Gelling points of decolorized globin gels by means of temperature sweeps	157
Table 3. Values of the behavior index (n) and consistency index (k) of decolorized globin gels produced at different pH. Average values \pm SD are reported	159
Table 4. Values of the parameters of the Burger model for all the gels studied	160
Table 5. Percentage elastic recovery of fresh and lyophilized globin gels produced at different pH	160
Table 6. Particle size (d _{4,3} , D _{50/90} and D _{10/50}) of decolorized globin gels produced at the studied pH. Average values \pm SD are reported	162
Table 7. Moisture content and % WHC loss for decolorized globin gels produced at pH 2, 7 and 7. Average values \pm SD are reported	164

CAPÍTULO 6. SÍNTESIS DE MATERIALES A PARTIR DE LAS PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN PLASMÁTICA

6.1. Geles sintetizados a partir del plasma

6.1.1. Rheological characterization and thermal behavior of porcine blood plasma protein gels

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model	172
Table 2. Gelling points of plasma gels made from fresh and lyophilized solutions by means of temperature sweeps	177
Table 3. Values of the behavior index (n) and consistency index (k) of plasma gels made from fresh and lyophilized solutions at different pH. Average values \pm SD are reported	180
Table 4. Values of the parameters of the Burger model for plasma gels made from fresh solutions (A) and plasma gels made from lyophilized solutions (B)	180

Table 5. Percentage elastic recovery of plasma gels made from fresh and lyophilized solutions at different pH	181
Table 6. Particle size (d ₄ , 3, D50/90 and D10/50) of plasma gels made from fresh solutions at the studied pH. Average values ± SD are reported	183
Table 7. Humidity and % loss of WHC for plasma gels made from fresh solutions at pH 2, 7 and 7. Average values ± SD are reported	184

6.1.2. Caracterización reológica de los geles de plasma sintetizados con glicerol

Tabla 1. Fluidos Newtoniano, dilatante, pseudoplástico y plástico Bingham como casos especiales del modelo Herschel-Bulkley (Steffe, 1996)	191
Tabla 2. Valores del índice de comportamiento (n) y del índice de consistencia (k) de geles de plasma sintetizados con diferentes concentraciones de glicerol a pH 2. Se muestran los valores medios ±DS (Desviación Standard)	195

6.2. Geles sintetizados a partir de las fracciones del plasma

6.2.1. Caracterización reológica de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas de plasma porcino

Tabla 1. Fluidos Newtoniano, dilatante, pseudoplástico y plástico Bingham como casos especiales del modelo Herschel-Bulkley (Steffe, 1996)	206
Tabla 2. Contenido proteico y de sólidos totales de las cuatro fracciones plasmáticas	209
Tabla 3. Puntos de gelificación de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas obtenidos a partir de los barridos de temperatura	213
Tabla 4. Valores del índice de comportamiento (n) y del índice de consistencia (k) de geles de fibrinógeno (F1) y γ -globulinas (F2). Se muestran los valores medios ±DS (Desviación Standard)	215
Tabla 5. Valores de los parámetros del modelo de Burger de geles de fibrinógeno (F1) y γ -globulinas (F2)	216
Table 6. Porcentaje de recuperación elástico de geles de las fracciones plasmática 1 y 2	217

Tabla 7. Tamaño de las partículas (d₄, 3, D50/90 and D10/50) de los geles de fibrinógeno y γ -globulinas. Se muestran los valores medios \pm DS (Desviación Standard) 219

Tabla 8. Humedad y % de pérdida de la CRA de geles de las fracciones plasmáticas 1 y 2 a pH neutro. Se muestran los valores medios \pm DS (Desviación Standard) 221

6.2.2. Rheological characterization of thermal gels of α and β -globulins from porcine blood plasma

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996) 230

Table 2. Protein and total solids content of the four plasma fractions 234

Table 3. Gelling points of gels made from fresh and lyophilized solutions by means of temperature sweeps 236

Table 4. Values of the behavior index (n) and consistency index (k) of gels made from fresh and lyophilized solutions at different pH. Average values \pm SD are reported 238

Table 5. Values of the parameters of the Burger model for all the gels studied 239

Table 6. Percentage elastic recovery of gels made from fresh and lyophilized solutions at different pH 239

Table 7. Particle size (d₄, 3, D50/90 and D10/50) of fresh F3 gels at the studied pH. Average values \pm SD are reported 241

6.2.3. Rheological characterization of thermal gels of porcine blood plasma albumins

Table 1. Newtonian, shear-thinning, shear-thickening and Bingham plastic fluids as special cases of the Herschel-Bulkley model (Steffe, 1996) 251

Table 2. Protein and total solids content of the albumin plasma fraction (F4) 255

Table 3. Gelling points of fresh and lyophilized gels made from F4 solutions by means of temperature sweeps 257

Table 4. Values of the behavior index (n) and consistency index (k) of gels made from albumin solutions at different pH. Average values \pm SD are reported	258
Table 5. Values of the parameters of the Burger model for all the gels studied	258
Table 6. Elastic recovery percentage of gels made from albumin solutions at different pH	259
Table 7. Particle size (d4, 3, D50/90 and D10/50) from fresh gels made of F4 solutions at pH studied. Average values \pm SD are reported	260

III. NOMENCLATURA

III.A. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	amperio
A	absorbancia
AA	aminoácidos
Ac	aceite
Ag	agua
BSA	seroalbúmina bovina
bv	volumen de lecho
C	centígrados
Cys	cisteína
C_{pi}	concentración de solutos en el permeado
C_{ri}	Concentración de solutos en el retenido
cm	centímetro
CMC	concentración micelar crítica
cP	centipoise
Da	dalton
DNA	ácido desoxirribonucleico
DQO	demanda química de oxígeno
DSC	análisis térmico diferencial
$d_{4,3}$	diámetro de volumen medio ponderado
E	emulsificación
EDTA	ácido etilendiamintetracético

F	flujo
FCV	factor de concentración volumétrica
g	fuerza de centrifugación
g	gramo
G'	módulo elástico o de almacenamiento
G''	módulo viscoso o de pérdidas
G*	módulo complejo
G ₀	módulo instantáneo elástico de la unidad Maxwell
hm	hectómetro
I	intensidad
IEx	intercambio iónico (Ion Exchange)
IF	índice de funcionalidad
<i>J</i>	compliance
<i>J</i> ₀	compliance instantánea
<i>J</i> ₁	compliance retardada
<i>J</i> _{0e}	compliance en estado estacionario
<i>K</i>	índice de consistencia
K	fuerza
ka	constante de disociación
KDa	kilodalton
kg	kilogramo
KPa	kilopascales
l	longitud
L	litro

L/S	líquido/sólido
m	masa
m	metro
M	molaridad
meq	miliequivalente
MF	microfiltración
mg	miligramos
min	minuto
mL	mililitros
mm	milímetro
mM	milimolar
n	índice de comportamiento
N	newton
N	normalidad
NAG	N-acetil glucosalina
NAM	N-acetil murámico
NF	nanofiltración
nm	nanómetro
OI	ósmosis inversa
Pa	pascales
pI	punto isoeléctrico
pka	-log ka
ppm	parte por millón
P/V	peso/volumen

qu	capacidad útil
r	valor medio de los diámetros externo e interno
R	radical
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
s	parámetro relacionado con la pendiente de la región pseudoplasma (Modelo de Carreau)
T ^a	temperatura
T _g	temperatura de gelificación
Try	triptófano
UF	ultrafiltración
u.m.a.	unidad de masa atómica
V	volumen
V _e	volumen de aceite emulsificado
V _a	volumen de aceite añadido
t	tiempo
°	grados
%	porcentaje

III.B. LETRAS GRIEGAS

α	alfa
β	beta
γ	deformación

γ_0	amplitud de deformación
$\dot{\gamma}$	velocidad de deformación
$\dot{\gamma}_c$	Velocidad de deformación crítica en el punto en el que el comportamiento deja de ser newtoniano (Modelo de Carreau)
γ	gamma
γ	tensión superficial
λ	longitud de onda
μ	micra
μm	micrómetros
η	velocidad de centrifugación
σ	energía específica de superficie
σ_i	eficacia de una membrana
ω	frecuencia
τ	esfuerzo cortante
τ_0	esfuerzo generado
δ	ángulo de desfase
μ	viscosidad
μ_a	viscosidad aparente
μ_0	viscosidad limitante de la zona newtoniana (Modelo de Carreau)
J	compliance
J_0	compliance instantánea
J_1	compliance retardada

J_{0e}	compliance en estado estacionario
λ_{ret}	tiempo de retardo (tiempo para alcanzar la máxima deformación)

IV. BIBLIOGRAFÍA GLOBAL

Almenara, F.J, Álvarez, S., Darias, J., Rodríguez, E., Díaz, C. y Fresno, M. (2007). "Efecto de la maduración en la composición de los quesos de cabra majorera". Arch. Zootec., 56 (Sup. 1): 667-671.

Ansaldi, D., Lester, P. (1999). PCT Int. Appl., 23.

Anson, M.L. and Mirsky A.E. (1932). "The effect of denaturation on the viscosity of protein systems". The Rockefeller Institute for Medical Research, (1932), 15 (3), 341-350.

Baldwin R.E., Sinthavalai S.J. (1974). "Fish protein concentrates foam", Food Sci, 39, 880-882.

Buttenworth, W. (1992). "Colloid and Surface Engineering: Applications in de Process Industries", Ed by R.A.

Cantor, C.R. Schimmel, P.R. (1980). "Biophysical Chemistry. Part 1: The conformation of biological macromolecules. Part 2: The behaviour of macromolecules". W.H., Freeman and Co, San Francisco.

Cordobés, F., Partal, P. & Guerrero, A. (2004). "Rheology and microstructure of heat induced egg yolk gels". Rheological Acta, 43, 184-195.

Chantrapornchai, W. & McClements, D.J. (2002). "Influence of NaCl on optical properties, large-strain rheology and water holding capacity of heat-induced whey protein isolate gels". Food Hydrocolloids, 16 (5), 467-476.

Cheftel J.C., Cuq J.L., Lorient D. (1989). "Proteínas alimentarias", Ed. Acribia, 49-96.

Cheryan, M. (1986). "Ultrafiltration Handbook", Technomic Publishing.

Claesson, P.M., Blomberg, E., Poptoshev, E. (2004). "Surface forces and emulsion stability in Food Emulsions". New York, NY. Chap.

Cohn, E.J. (1948). "The history of plasma fractionation". In Advances in Military Medicine, Andrus et al. Eds. Little, Brown & Co.

Dávila, E., Parés, D., Cuvelier, G., & Relkin, P. (2007). "Heat induced gelation of porcine blood plasma proteins as affected by pH". Meat Science, 76, 216-225.

De Bernardez Clark E. (2001). "Protein refolding for industrial processes". Curr. Opin. Biotechnol., 12, 202-207.

Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M., and Díaz, M. (2007). " Desmineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration". *Meat Science*, 76 (2007), 402-410.

Del Hoyo, P., Rendueles, M., & Díaz, M. (2007). "Effect of processing on functional properties of animal blood plasma". *Meat Science*, 78, 522-528.

Dolz, M., Hernández, M. J. & Delegido, J. (2006). "Creep and recovery experimental investigation of low oil content food emulsions". *Food Hydrocolloids*, 22, 421-247.

Deutscher, M.P. (1990). "Guide to Protein Purification", *Methods in Enzymology*, MBG Cornell (USA), (1990), Vol 182, 83.

De Vouno M., Penteadó C., Lajolo F.M. and Dos Santos P. (1975). "Functional and nutritional of isolated bovine blood protein", *J. Sci. Food Agric.*, 30, 8, 809-815.

Dion, D.M., O'Connor, K., Phillips, D., Vella, G.J., Warren, W. (1990). *Journal of Chromatography* 535, 127-45.

Donovan, J.M., Mapes, C.J. Davis, J.G. & Garibaldi, J.A. (1975). "A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation". *J. Sci. Food Agric.*, 26, 73-83.

Dorfner. (1991). *Ion Exchangers*. Walter de Gruyter. New York.

Ernest, M. V. Jr.; Whitley, R. D.; Ma, Z.; Wang, N.-H. L. (1997). "Effects of mass action equilibria on fixed-bed multicomponent ion-exchange dynamics", *Ind. Eng. Chem. Res. ACS*, Washington, DC, USA, v 36, n 1, 212-226.

Etoh, T., Miyazaki, M. Iwatake, M., Harada, K., Nakayama, M., Sugii, A. (1991). *Fac. Pharm. Sci., Kumamoto Univ., Kumamoto, Japan. Analytical Sciences*.

Farreras, P. (1992). "Medicina Interna", Ed. Doyma S.A. Madrid, 2, 1571-1581.

Fernández, A., Díaz, M. (1995). "Aprovechamiento de los Residuos de la Industria Alimentaria", *Alimentación: equipos y tecnologías*, Abril, 105-111.

Fernando, T. (1981). *Biotechnology & Bioengineering*, 23- 19.

Galiano, I. (1993). "Los Subproductos Procedentes de los Animales de Avasto", *Eurocarne*, 17, 61-68.

Ghost R. (2001). "Fractionating of biological macromolecules using carrier phase ultrafiltration". *Biotechnolog. Bioeng.*, 74, 1-11.

Ghost, R., Cui, Z.F. (1998). *Journal of Membrane Science*, 139, 17-28.

- Ghost R. and Cui Z.F. (2000). "Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane". *J. Membr. Sci.* 167, 47-53.
- Goldsmith, R., De Filippi, R.P. (1971). "Industrial Ultrafiltration In Membrane Processes in Industry and Biomedicine", Ed. Plenum Press, London.
- Gras, J. (1983). "Plasma Proteins". Ed. Lims.
- Harris, E.R.V. (1989). "Protein purification methods: a practical approach". Oxford Univ.Oxford.
- Helferich, F. (1962). Ed. McGraw-Hill, Ion Exchange, New York.
- Herve, D. (1974). *Proc. Biochem.* 92, 16.
- Higgin, I.R. (1969). *Chem. Eng. Prog.*, 65, 62.
- Hiraoka, Y., Itoh, K., Taneya, S. (1979). *Tech. Res. Inst., Snow Brand Milk Prod. Co.* 34(7), 397-400.
- Houldsworth, D.W. (1980). *J. Soc. Dairy Technol*, 33, 45.
- Hutson. T. (1998). "Proceedings of the 2nd International Whey Conference on Whey", Chicago, 1997, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 88-92.
- Howell, N. K., &Lawrie, R.A. (1984). "Functional aspects of blood plasma proteins. II. Gelling properties". *J. Food Technol.*, 19, 289-295.
- http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/CultbBact/Reque.htm. (consultado abril 2010)
- Inklar P.A., Fortuin. (1969). "Determining the emulsifying and emulsion stabilizing capacity of protein meat additives", *J. Food Technol*, 39, 103-107.
- Izidoro, D. R., Scheer, A.P., Sierakowski, M. R. & Haminiuk C. W. (2008). "Influence of green banana pulp on rheological behavior and chemical characteristics of emulsions (mayonnaises)". *LWT- Food Science and Technology* 41 (6), 1018-1028.
- Jayaswal, N., Sinha, S., Kumar, A. (2001). "Effect of chemical modifications upon exchange capacity of aminated macroporous styrene-divinyl benzene (PS-DVB) copolymer anion exchange resin", *J. Appl. Polym. Sci.*, v79, n101,735-1748.
- Jolles P. (1962). "Lysozymes from rabbit spleen and dog spleen". *Methods Enzymol.*, 5, 137-140.
- Jönsson, H.B. and Olsson L.E. (1981). *Milchwissenschaft* 36, 8.

Juszczak, L., Fortuna, T. & Kosla, A. (2003). "Sensory and rheological properties of Polish commercial mayonnaise". *Die Nahrung*, 47(4), 232-235.

Khan D.W., Bulter M.D., Cohen D.L., Gordon M., Khan J.W and Winkler M.E. (2000). "Purification of plasmid DNA by tangential flow filtration". *Biotechnology Bioeng*, 69, 101-106.

Kneifel, W., Paquin, P., Albert, T. & Richard, J.P. (1991). "Water-holding capacity of proteins with special regard to milk proteins and methodological aspects-a review". *J. Dairy Sci.*, 74(7), 2027-2041.

Kozinski, A.A., Lightfoot, E.N. (1972). "Protein ultrafiltration. General example of boundary layer filtration". *American Institute of Chemical Engineers*, (1972), 18, 5, 1040.

Laca, A., Sáenz, M., Paredes, B., &Díaz, M. (2009). "Rheological properties, stability and sensory evaluation of low cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent". *J. Food Eng.*, 97, 243-252.

Lamsal, B.P., Jung, S, & Johnson, L.A. (2007). "Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis". *LWT-Food Science and Technology*, 40(7), 1215-1223.

Lawal, O. S., Adebowale, K. O., Ogunsanwo, B. M., Sosanwo, O. A., Bankole, S. A. (2005). "On the functional properties of globulin and albumin protein fractions and flours of African locust bean (*Parkia biglobosa*)". *Food Chemistry*, 92, 681-691.

Lehninger, A.L. (1978). "Bioquímica". Ed. Omega, 121-141.

Li M., Zhang G., Su Z. (2002). "Dual gradient ion-exchange chromatography improved refolding yield lisozyme". *J. Chromatogr. A*, Volume 959, Number 1, 113-120.

Linden G., Lorient D. (1994). "Bioquímica Agroindustrial". Ed. Acribia, S.A. 44.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951). "Protein measurement with folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Mahler, H.R., E.H. Cordes (1971). "Biological Chemistry", 2nd ed., Harper and Row Pub., New York, (1971).

Marinsky, J. A, Marcel Dekker. (1984). Ed. Ion exchange, A series of Advances, New York.

Martinache, L., Henon, M.P., Curling, J.M. (1988). "Concentration and desalting by ultrafiltration. In *Methods of Plasma Protein Fractionation*", Ed. Academic Press, London, U.K.

Moure, F. (2000). Isolation of blood proteins. Analysis of possibilities. (In spanish).

Moure, F., Rendueles, M., Díaz, M. (2004). "Plasma protein fractionation by ion exchange chromatography". *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 27 (1), 17-24.

Murata, M., Tani, F., Higasa, T., Kitabatake, N., & Doi, E. (1993). "Heat-induced transparent gel formation of bovine serum albumin". *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 57(1), 43-46.

Natarajan, V., Cramer, S. (2000). "Methodology for the characterization of ion-exchange resins", *Separat. Sci. Technol.*, v35, n11.

Nuthong, P., Benjakul S. & Prodpran T. (2009). "Effect of some factors and pretreatment on the properties of porcine plasma protein-based films". *LWT- Food Science and Technology*, 42, 1545-1552.

Ockerman, H.W., Hansen, C.L. (1994). "Industrialización de Subproductos de Origen Animal", Ed. Acribia S.A., Zaragoza. 239-252.

Ockerman, H. W., & Hansen, C. L. (1998). "Animal by-product processing and utilization". Florida, USA: CRC Press.

Oshodi, A. & Ojokan, E. (1997). "Effect of salts on some of the functional properties of bovine plasma protein concentrate". *Food Chem.*, 59, 333-338.

Pilosof AMR. (2000). Bartholomai GB (eds). *Caracterización funcional y estructural de proteínas*. Eudeba, Buenos Aires, pp 75–95.

Parés, D., & Ledward, D. A. (2001). "Emulsifying and gelling properties of porcine blood plasma as influenced by high-pressure processing". *Food Chem.*, 74 (2), 139-145.

Pares D., Saguer E., Sanchez E. y Carretero C. (1998). "Estabilidad durante el almacenamiento de las propiedades funcionales del plasma porcino deshidratado". *Alimentación, Equipos y Tecnología- Enero/Febrero*, págs: 97-102.

Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J., & Carretero, C. (1998). "Functional properties of heat induced gels from liquid and spray-dried porcine blood plasma as influence by pH". *J. Food Sci.*, 63(6), 958-961.

Prandl, O., Fisher, A, Schmidhofer, T. (1994). "Tecnología e Higiene de la Carne", Ed. Acribia S.A., Zaragoza, 517-526.

Privalov P.L. (1979). "Stability of proteins", Academic Press, New York, Vol. 33.

Privalov, P.L., Tiktopulo, E.I., Venyaminov S.Yu, Griko, YuV., Makhatadze, G.I., Khechinashvili <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283689903185> - AFF2#AFF2, N.N. (1989). "Heat capacity and conformation of proteins in the denatured state". *Journal of Molecular Biology*, 737-750.

Rampon, V., Brossard, C., Mouhous-Riou, N., Bousseau, B., Llamas, G., Genot, C. (2004). "The nature of the apolar phase influences the structure of the protein emulsifier in oil-in-water emulsions stabilized by bovine serum albumin". A front-surface fluorescence study. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 108-09, 87-94.

Ragab, D. M., Babiker, E. E., Eltinay, A. H. (2003). "Fractionation, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration". *Food Chemistry*, 84, 207-212.

Real del Sol, E., Martin Yero, M. (1991). "Empleo de la Ultrafiltración en la Obtención de Concentrados del Plasma Sanguíneo", *Alimentaria*, 228, 21-23.

Rendueles, M., Moure, F., Fernández, A., Díaz, M. (1996). "Preliminary studies on the processing of Slaughterhouses Blood for Protein Recovery". *Resource and Environmental Biotechnology*, 1, 193-206.

Rousset, F., Rebou, P. (1998). *Proceedings of the 2nd International Whey Conference on Whey*, Chicago, 1997, International Dairy Federation, Brussels, Belgium, 93-99.

Ruthven, Ed. John Wiley & Sons, D.M. (1984). *Principles of Adsorption Process*, New York.

Saguer, E., Fort, N., Álvares, P. A., Sedman J., & Ismail, A. (2008). "Structure-functionality relationships of porcine plasma proteins probed by FTIR spectroscopy and texture analysis". *Food Hydrocolloids* 22(3), 459-467.

Salvador, P., Toldrá, M., Saguer, E., Carretero, C., & Parés, D. (2009). "Microstructure-function relationships of heat induced gels of porcine haemoglobin". *Food Hydrocolloids*, 23, 1654-1659.

Sánchez, C., Burgos, J. (1997). Gelation of sunflower globulin hydrolysates: rheological and calorimetric studies. *J Agric. Food Chem.*, 45,2407-2412.

Simon A., Vandanjon L., Levesque, Bourseau P. (2002). "Concentration and desalination of fish gelatin by ultrafiltration and continuous diafiltration processes". *Desalination*, 144, 313-318.

Silva, V., & Silvestre, M. (2003). "Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food". *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 709-718.

- Stauton, E. (1969). "Bioquímica Médica", Ed. Interamericana, Madrid, 431-445.
- Steffe, J. F. (1996). Rheological methods in food process engineering. USA: Freeman Press.
- Tabilo-Munizaga, G., & Barbosa- Cánovas, G.V., (2005). "Rheology for the food industry". J. Food Eng., 67(1-2), 147-156.
- Toldra, M., Elias, A., Pares, D., Saguer, E., Carretero, C. (2004). "Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure". Food Chemistry, 88, 461-468.
- Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., Inouye, K. (2005). "Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis". LWT--Food Science and Technology, 38, 255-261.
- Tybor, P.T., Dill C.W., Landman. (1973). "Effect of decolorization and lactosa incorporation on the emulsification capacity of spray-dried blood protein concentrates". J. Food Sci, 38, 4-6.
- USDA reports <http://usda.mannlib.cornell.edu/reports/nassr/livestock/zma-bb/> (visited October 2005).
- Walstra, P. (2003). Physical Chemistry of Foods. Marcel Decker. New York.
- Wang, C., & Damodaran, S. (1991). "Thermal gelation of globular proteins: influence of protein conformation on gel strength". J. Agric. Food Chem., 39(3), 433-438.
- Wang, Y., Ghos,R., Zhanfeng, C. (2002). "High-resolution ultrafiltration processes for protein fractionation" ,Desalination, 144, 301-306.
- Wang, J., Wang, S., Hao, J., Lu, G. (2002). "The desalting property of ion-exchange resins in organic solvent". Chemical Engineering Research Center. Tianjin University. Chinese Journal of Chemical Engineering, 10, 567-569.
- Watson, J.S. (1990). Elsevier Applied Science Ed. Recent Developments in Ion Exchange 2, P.A. Willians and M.J. Hudson, London, pp.277.
- Wilde, P., Mackie, A., Husband, F., Gunning, P., Morris, V. (2004). "Proteins and emulsifiers at liquid interfaces". Adv. Colloid Interface Sci.,108-09, 63-71.
- Wismer-Pedersen, J. (1979). "Use of haemoglobin in foods utilization of animal Blood in Meat Products". Food technology, 33 , 76-80.
- Worrasinchai, S., Suphantharika, M., Pinjai, S., & Jammong, P. (2006). "β-Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise". Food Hydrocolloids, 20(1), 68-78.

Yasuda, K., Nakamura, R., & Hayakawa, S. (1986).” Factors effecting heat-induced gel formation of bovine serum albumin”. *J. Food Sci.*, 51(5), 1289-1292.

V. DIFUSIÓN DE LA TESIS

V.A. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

CAPÍTULO 3

Título: “Demineralization by ion exchange of slaughterhouse porcine blood plasma”

Autores: Moure, F., Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Publicado en “Journal of Food Process Engineering”

Título: “Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration”

Autores: Del Hoyo, P., Moure, F., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Publicado en “Meat Science”

CAPÍTULO 4

Título: “Determinación por viscosimetría de la desnaturalización de proteínas sometidas a operaciones de desmineralización”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Pendiente de envío para su revisión

Título: “Effect of processing on functional properties of animal blood plasma”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Publicado en “Meat Science”

Título: “Desnaturalización y renaturalización de proteínas procedentes de residuos alimenticios”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Pendiente de envío para su revisión

CAPÍTULO 5

Título: “Rheological characterization of heat induced gels of porcine haemoglobin”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: En revisión

Título: “Decolorized porcine globin gels produced by heat-induced gelation. Physical and rheological”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: En revisión

CAPÍTULO 6

Título: “Rheological characterization and thermal behavior of porcine blood plasma protein gels”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: En revisión

Título: “Caracterización reológica de los geles de plasma sintetizados con glycerol”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Pendiente de envío para su revisión

Título: “Caracterización reológica de los geles de fibrinógeno y α -globulinas de plasma porcino”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Pendiente de envío para su revisión

Título: “Rheological characterization of thermal gels of α and β -globulins from porcine blood plasma”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Pendiente de envío para su revisión

Título: “Rheological characterization of thermal gels of porcine blood plasma albumins”

Autores: Del Hoyo, P., Rendueles, M. y Díaz, M.

Situación actual: Pendiente de envío para su revisión

V.B. CONGRESO INTERNACIONAL

XIIIth World Congress of Food Science and Technology “FOOD IS LIFE”. Nantes, Septiembre 2006.

Poster presentado: “Influence of the demineralization techniques on the functional properties of blood plasma proteins”