

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL
(ETSIAMN)

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA



Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora en la extracción de la enzima ferroquelatasa a partir del hígado de cerdo

Curso 2018/19

TRABAJO FIN DE GRADO

Autor:

José Vicente Pedrero González

Tutor:

José Vicente García Pérez

Valencia, Julio de 2019



Alumno: D. José Vicente Pedrero González

Tutor: D. José Vicente García Pérez

Valencia, Julio de 2019

Título: Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora en la extracción de la enzima ferroquelatasa a partir del hígado de cerdo

Resumen:

La zinc-protoporfirina (ZnPP) es un pigmento natural en el cual el átomo de hierro del anillo porfirínico ha sido sustituido por un átomo de zinc, reacción catalizada por la enzima ferroquelatasa (FeQ). Este pigmento ha sido recientemente descrito en productos cárnicos sin nitritos ni nitratos añadidos, como por ejemplo en el Jamón de Parma. Por su color rojo característico y estabilidad frente a la luz y el calor, este pigmento podría ser usado en la mejora del color de diferentes productos cárnicos. Sin embargo, los mecanismos relativos a la formación de ZnPP no han sido completamente elucidados y la extracción de la FeQ a partir del hígado de cerdo no ha sido aún optimizada. Por otro lado, se sabe que la aplicación de ultrasonidos de potencia (USdP) facilita la extracción de diversos compuestos de interés, incluidas las enzimas.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la viabilidad del uso de los USdP para mejorar la extracción de la enzima FeQ a partir del hígado de cerdo. Así, se intentaron determinar las condiciones óptimas de extracción del enzima a partir del hígado utilizando un sistema ultrasónico tipo sonda y variando tanto el tiempo de aplicación de los ultrasonidos (1, 2.5 y 5 min) como la frecuencia de aplicación de los mismos (continua vs pulsada). La extracción asistida por USdP se comparó frente a la modalidad convencional, la cual consiste en agitación magnética durante 30 min. Utilizando los extractos enzimáticos de FeQ obtenidos en las diferentes condiciones ensayadas, se determinó la cinética de formación de ZnPP, evaluando tanto la velocidad de la reacción como el producto final obtenido.

La aplicación de los USdP demostró ser un método eficaz para la extracción de la enzima, traduciéndose en mejoras significativas ($p < 0.05$) en la velocidad de la reacción y en el producto máximo formado. Tanto el tiempo de aplicación de los USdP como la frecuencia de aplicación de los mismos, resultaron ser factores determinantes sobre el rendimiento de la extracción. De entre todas las condiciones ensayadas, la modalidad de extracción óptima fue aplicar los USdP durante 1 min de manera continua. La influencia de los ultrasonidos sobre la actividad de la enzima y su repercusión sobre los resultados son aspectos que deben tratarse con mayor profundidad en trabajos posteriores. A pesar de ello, este trabajo pone de manifiesto el potencial de la tecnología ultrasónica para mejorar la extracción de la FeQ a partir del hígado de cerdo, no solo porque permite extraer una concentración superior de enzima si no también por el importante ahorro de tiempo que supone respecto a la extracción convencional.

Palabras clave: ferroquelatasa, zinc-protoporfirina, ultrasonidos, hígado, cerdo

Student: D. José Vicente Pedrero González

Professor: D. José Vicente García Pérez

Valencia, June 2019

Title: Application of power ultrasound for the improvement in the extraction of the enzyme ferrochelatase from the pork liver.

Abstract:

Zinc-protoporphyrin (ZnPP) is a natural pigment in which the iron atom of the porphyrin ring has been replaced by a zinc atom, reaction catalyzed by the enzyme ferrochelatase (FeCH). This pigment has been recently described in meat products without added nitrites or nitrates, as for example in Parma Ham. Due to its characteristic red color and stability against light and heat, this pigment could be used to improve the color of different meat products. However, the mechanisms related to the formation of ZnPP have not been completely elucidated and the extraction of FeQ from pork liver has not been optimized yet. On the other hand, it is known that the application of power ultrasound (PUS) facilitates the extraction of numerous compounds of interest, including enzymes

Therefore, the objective of this work was to evaluate the feasibility of using the PUS to improve the extraction of the enzyme FeCH from pork liver. Thus, we tried to determine the optimal conditions of extraction of the enzyme from the liver using a probe-type ultrasonic system and varying both the time of application of ultrasound (1, 2.5 and 5 min) and the frequency of application (continuous vs pulsed). The PUS-assisted extraction was compared to the conventional method of extraction, which consists of magnetic stirring for 30 min. Using the enzymatic extracts of FeCH obtained in the different conditions tested, the kinetics of ZnPP formation was determined, evaluating both the reaction speed and the final product obtained.

The application of the PUS proved to be an effective method for the extraction of the enzyme, resulting in significant improvements ($p < 0.05$) in the reaction speed and in the maximum product formed. Both the time of application and the frequency of application, turned out to be determining factors on the performance of the extraction. Among all the conditions tested, the optimal one was to apply the PUS continuously for 1 min. The influence of ultrasound on the activity of the enzyme and its repercussion on the results are aspects that should be treated in greater depth by later works. Despite that, this work highlights the potential of ultrasonic technology to improve the extraction of FeCH from pork liver, not only because it allows extracting a higher concentration of enzyme but also because of the notorious time saving with respect to the conventional method of extraction.

Key words: ferrochelatase, zinc-protoporphyrin, ultrasound, liver, pork

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, José Vicente, por haberme ofrecido la oportunidad y haberme transmitido sus conocimientos desde la cercanía y la experiencia.

A mi tutora experimental, Blanca, por su paciencia, sus consejos y su ayuda constante desde el primer día.

A mi amigo y compañero de trabajo, Fer, porque sin su colaboración, su sentido del humor y su forma de ser nada hubiera sido igual.

Al resto de compañeros, por sus ánimos y por haberme hecho sentir tan agusto durante estos meses.

A toda la gente del grupo ASPA por su amabilidad y ayuda en todo lo que he necesitado.

Al departamento de Bioquímica, y en especial a Consuelo, por permitirnos usar el fluorímetro y ofrecernos cada día su mejor sonrisa.

A mis amigos y compañeros de la carrera, que han hecho de estos cuatro años una experiencia inolvidable.

Y por supuesto a mi familia, y sobre todo a mi hermano Juan y mi novia Patri, por apoyarme y demostrarme que todo esfuerzo tiene su recompensa.

Muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	I
1.1 La situación actual de la industria cárnica en España	I
1.2 El curado del jamón	II
1.3 El papel de los agentes nitrificantes en el curado y sus riesgos para la salud.....	III
1.3 La zinc protoporfirina (ZnPP) como agente de curado	V
1.4 La ferroquelatasa (FeQ) como enzima formadora de ZnPP y el hígado como fuente para obtenerla.....	VII
1.5 Los ultrasonidos de potencia (USdP) para la intensificación de procesos de extracción ...	IX
2. OBJETIVOS	XI
3. MATERIALES Y MÉTODOS	XII
3.1 Materia prima	XII
3.2 Protocolo	XII
3.2.1 Extracción de la enzima	XII
3.2.2 Reacción enzimática	XIII
3.2.3 Cuantificación del producto de la reacción	XV
3.3 Análisis de resultados	XVII
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	XIX
4.1 Extracción convencional	XIX
4.2 Extracción asistida por USdP	XXI
4.3 Influencia del tiempo de aplicación de los USdP	XXIII
4.4 Influencia de la frecuencia de aplicación de los USdP	XXV
5. CONCLUSIONES	XXVII
6. BIBLIOGRAFÍA	XXVIII

ÍNDICE FIGURAS

<i>Figura 1.1: Vías de exposición humana a nitratos y nitritos con sus posibles efectos en el organismo</i>	<i>IV</i>
<i>Figura 1.2: Estructura química del grupo hemo</i>	<i>V</i>
<i>Figura 1.3: Jamón de Parma y logotipo de la marca protegida con denominación de origen</i>	<i>VI</i>
<i>Figura 1.4: Estructura química de la Zinc(II) Protoporfirina IX.....</i>	<i>VI</i>
<i>Figura 1.5: Reacción catalizada por la ferroquelatasa (FeQ) en presencia de hierro.....</i>	<i>VIII</i>
<i>Figura 3.1: Montaje experimental para la extracción convencional.....</i>	<i>XII</i>
<i>Figura 3.2: Montaje experimental para la extracción asistida por ultrasonidos.</i>	<i>XIII</i>
<i>Figura 3.3: Equipo empleado para el desarrollo de la reacción enzimática.....</i>	<i>XV</i>
<i>Figura 3.4: Equipo empleado para la lectura del producto de la reacción.....</i>	<i>XVI</i>
<i>Figura 3.5: Recta de calibrado fluorescencia vs concentración ZnPP.....</i>	<i>XVI</i>
<i>Figura 4.1: Cinética de reacción tras extracción convencional (30 min agitación); se muestran los valores medios \pm desviación típica.....</i>	<i>XIX</i>
<i>Figura 4.2: Cinética de reacción tras extracción asistida por USdP (5 min); se muestran los valores medios \pm desviación típica</i>	<i>XXI</i>
<i>Figura 4.3: Análisis estadístico de la influencia de la aplicación de USdP (5 min); se muestran valores medios \pm intervalo de confianza LSD 95%.....</i>	<i>XXII</i>
<i>Figura 4.4: Cinéticas de reacción tras extracción asistida por USdP (5, 2.5 y 1 min), se muestran valores medios \pm desviación típica</i>	<i>XXIII</i>
<i>Figura 4.5: Análisis estadístico de la influencia del tiempo de aplicación de USdP (1 min, 2.5 min y 5 min); se muestran valores medios \pm intervalo de confianza LSD 95%.....</i>	<i>XXIV</i>
<i>Figura 4.6: Cinéticas de reacción tras extracción asistida por USdP de manera pulsada (5, 2.5 y 1 min), se muestran valores medios \pm desviación típica</i>	<i>XXV</i>
<i>Figura 4.7: Análisis estadístico de la influencia del tiempo de aplicación de USdP pulsados (1 min, 2.5 min y 5 min); se muestran valores medios \pm intervalo de confianza LSD 95</i>	<i>XXVI</i>
<i>Figura 4.8: Análisis estadístico de la influencia de la frecuencia de aplicación de USdP (continua vs pulsada); se muestran valores medios \pm intervalo de confianza LSD 95%.....</i>	<i>XXVI</i>

ÍNDICE TABLAS

<i>Tabla 1.1: Valores vigentes de Ingesta Diaria Admisible (IDA) para nitratos y nitritos en miligramos por kg de peso corporal y por día (EFSA, 2017)</i>	<i>V</i>
<i>Tabla 1.2: Tipos de ultrasonidos y características diferenciales</i>	<i>IX</i>
<i>Tabla 3.1: Combinación de reactivos para cada grupo.....</i>	<i>XIV</i>
<i>Tabla 4.1: Valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica para la cinética de extracción convencional (30 min agitación)</i>	<i>XIX</i>
<i>Tabla 4.2: Valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica para la cinética de extracción asistida por USdP (5 min).....</i>	<i>XXI</i>
<i>Tabla 4.3: Valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica para la cinética de extracción asistida por USdP (2.5 y 1 min)</i>	<i>XXIII</i>
<i>Tabla 4.4: Valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica para la cinética de extracción asistida por USdP de manera pulsada (5, 2.5 y 1 min)</i>	<i>XXV</i>

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La situación actual de la industria cárnica en España

La industria cárnica tiene un gran peso en nuestra economía ocupando con diferencia el primer lugar de toda la industria española de alimentos y bebidas. Representa una cifra de negocio de 26207 millones de euros lo que supone el 22.1% de todo el sector alimentario español y el 2.2% del PIB total español (ANICE, 2019). Sin embargo, la imagen de ésta y de los productos cárnicos se ha ido deteriorando en los últimos años por diversos motivos. Alguno de ellos es su asociación con las patologías más prevalentes como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer (OMS, 2015) así como por la demanda de productos más saludables, sin conservantes, sin alérgenos o con un etiquetado “más limpio” (OCU, 2018). Así pues, los productos cárnicos están en permanente observación por parte de instituciones y consumidores. Por ello, el desarrollo de productos cárnicos de acuerdo con estas tendencias resulta de gran interés y podría contribuir a mejorar su imagen. Además, en general se demanda que la industria cárnica sea sostenible y trate de minimizar el impacto ambiental (Directiva 2008/98/CE). Por este motivo, hay cada vez un mayor interés hacia la máxima recuperación y valorización de los recursos que ofrece esta industria (Ottles *et al.*, 2015).

La especie ganadera con mayor producción de carne en nuestro país es el cerdo, con 4.5 millones de toneladas anuales (ANICE, 2019). Sin embargo, al mismo tiempo es la especie que mayor cantidad de co-productos y subproductos genera. Dentro de los co-productos se incluyen aquellas partes que, aun siendo comestibles, son generalmente poco consumidas o comercializadas. La mayoría de estos co-productos tienen un escaso valor comercial si bien son interesantes desde un punto de vista nutricional y tecnológico. Uno de ellos es el hígado, un alimento que siempre ha formado parte de nuestra dieta, pero cuya popularidad ha ido disminuyendo con las tendencias actuales de consumo. Además de constituir una elevada fuente de proteínas, en el hígado existen una gran cantidad de enzimas y otros compuestos valiosos que pueden ser aprovechados. Sin embargo, la recuperación de éstos es un desafío importante dado que su posterior implementación comercial exige una aproximación compleja que debe considerar numerosos factores. Los procesos de recuperación y valorización no sólo deben mantener las propiedades funcionales del compuesto objetivo, sino que además deben cumplir con las exigentes expectativas de los consumidores en materia de seguridad y características organolépticas. En consecuencia, es necesario el estudio y desarrollo de sistemas para la obtención de productos con valor añadido a partir de co-productos y subproductos de origen animal los cuales permitan nuevas vías de aprovechamiento y una mayor rentabilidad para el sector. A pesar de estas dificultades, en el mercado se pueden encontrar casos exitosos de valorización de subproductos de origen animal como pueden ser los colágenos, las gelatinas, así como diversos productos derivados de glóbulos rojos y de hemoglobina, los cuales son usados para mejorar el color de los productos cárnicos (SONAC, 2019; LICAN 2019; ESSENTIA, 2019). Por tanto, el uso potencial de ingredientes procedentes de co-productos y subproductos de origen animal con funcionalidad tecnológica representa una gran oportunidad para la diversificación de este sector productivo.

1.2 El curado del jamón

España es uno de los países con una tradición más rica en la elaboración y consumo de embutidos y jamones. La producción charcutera, que se extiende a todos los rincones de nuestro país, forma parte de nuestro acervo cultural y gastronómico, y es apreciada dentro y fuera de nuestras fronteras. De entre toda la variedad, los jamones curados, ya sean serranos o ibéricos siguen siendo los reyes de la producción cárnica de nuestro país (ANICE, 2019). Ambos sufren el llamado proceso de curación en el que desarrollan todo su aroma y sabor. La diferencia entre ambos tipos de jamones no reside entonces en el proceso, sino en la materia que es utilizada. Mientras el jamón serrano se elabora con cerdos de raza blanca, el jamón ibérico se elabora con cerdos de raza ibérica. Sin embargo, aunque el proceso es el mismo, si que hay diferencias en el tiempo de curación con un mínimo de 720 días (24 meses) para el ibérico y un mínimo de 210 días (7 meses) para el serrano. Además, dentro de los jamones serranos existen distintas menciones o denominaciones en función de los tiempos de curación: Bodega (de 9 a 12 meses), Reserva (de 12 a 15 meses) y Gran Reserva (más de 15 meses) (BOE, 14/07/2008). En general, el curado está considerado como un proceso de conservación y sazonado de alimentos al que no solo se somete la carne de cerdo sino también algunos pescados y carnes rojas. Para lograr curar la carne se necesita una combinación de sal, azúcar, nitratos, nitritos y tiempo. Haciendo una gran simplificación del proceso de curado podemos decir que con éste buscamos evitar una descomposición rápida de los alimentos, extrayendo el agua y evitando la propagación de microorganismos (NICOJAMONES, 2018). El proceso en sí consta de cuatro fases: salado, postsalado, secado/maduración y envejecimiento (Rodríguez, 1997):

- Salado (o salazón). Es el primer paso en el proceso de curación del jamón y consiste en cubrir las piezas con sal común con el fin de que ésta penetre homogéneamente en toda la masa muscular. Puede que sea la parte más importante de todo el proceso, ya que la calidad de los jamones se basa en gran medida en la mayor o menor actuación de la sal. La sal aplicada a los jamones ayuda en la deshidratación, juega un papel importante en la conservación (agente bacteriostático) y contribuye a modificaciones relevantes de la estructura proteica. Las condiciones de temperatura, humedad y ventilación de la cámara de salado deben estar controladas para inhibir el desarrollo de microorganismos y reducir la actividad del agua en la pieza sin llegar a una desecación externa con la aparición del encostramiento. Para este proceso la temperatura de la cámara debe estar entre 0 y 4 °C y la humedad relativa entre el 75% y el 95%. Además de la sal, se suelen añadir diversos aditivos e ingredientes como nitritos, nitratos, azúcar, correctores de acidez, etc.

- Postsalado. Las piezas son llevadas después a las cámaras de postsalado o reposo donde la sal y los nitrificantes van distribuyéndose por el interior de la pieza inhibiendo el crecimiento microbiano y canalizando los procesos bioquímicos de hidrólisis responsables de producir el aroma y sabor tan característicos del jamón. El tiempo de permanencia de las piezas en esta fase comprenderá un periodo mínimo de 40 días, aunque es variable en función del contenido graso de cada pieza ya que la penetración salina por difusión está muy condicionada por la presencia de grasa. Por último, se debe eliminar la sal superficial con lavados de agua caliente o con aire comprimido.

- Secado. El secado es el tratamiento mediante el cual se reduce la cantidad de agua presente en los jamones y paletas. También, en su etapa final y con el aumento de la temperatura, tiene

lugar el sudado o fusión natural de parte de las grasas de su tejido adiposo. Esta difusión de la grasa entre las fibras musculares permitirá retener el aroma. Además, el jamón sufre procesos de proteólisis que contribuyen a la terneza y el sabor, y de lipólisis que contribuyen al aroma. Durante la primera fase de secado, tiene lugar una deshidratación lenta de las piezas con unas condiciones de alta humedad relativa y bajas temperaturas. Durante una segunda fase de secado, prosigue la deshidratación paulatina del producto y el sudado de parte de las grasas. En esta fase se sube muy levemente la temperatura y se controla la humedad durante 30 días. Esta etapa se puede realizar en el mismo secadero o bien en una bodega controlando que la temperatura no exceda de 34º °C y la humedad relativa se encuentre en valores entre el 60% y el 80%.

- Envejecimiento. Esta es una fase de afinamiento con el fin de que el jamón adquiera sus propiedades finales tan características. Después de una clasificación previa según su peso, calidad y conformación, los jamones maduran lentamente en la bodega hasta concluir la curación. Las condiciones de temperatura y humedad son controladas y los tiempos requeridos varían en función de la clasificación anterior.

1.3 El papel de los agentes nitrificantes en el curado y sus riesgos para la salud

Los agentes nitrificantes: nitrito potásico (E249), nitrito sódico (E250), nitrato sódico (E251) y nitrato potásico (E252), son una parte fundamental del proceso de curado. El empleo de estas sales nitrificantes está totalmente extendido en los procesos de elaboración del jamón curado ya que se aplican durante el salado o inmediatamente antes de él, en una acción conocida como 'presalado' o 'restregón' que se practica desde épocas tardorromanas (Ventanas, 2012).

El nitrito es la forma reducida del nitrato y es el que tiene un papel activo en determinadas funciones durante la elaboración del producto. En consecuencia, es el que experimenta una rápida depleción en el producto. Por eso se suelen añadir también los nitratos, para actuar como fuente de nitritos a lo largo del tiempo de curación.

La función más conocida e importante de estos agentes es la de aportar estabilidad y seguridad alimentaria al producto desde el punto de vista microbiológico. El nitrito juega un papel fundamental para la inhibición de microorganismos tanto alterantes como patógenos. En concreto, es muy conocido el efecto antimicrobiano que tiene el nitrito frente a *Clostridium botulinum* en condiciones de riesgo como aquellas que se dan en los jamones curados con un pH próximo a 6, un nivel del sal entre el 3.5 - 4 % y temperaturas del orden de los 20 °C durante el procesado (Asensio y Díaz, 2001).

Al mismo tiempo, son también responsables de la formación y estabilidad del color característico del jamón curado. El desarrollo de la reacción de curado en presencia de estos agentes nitrificantes conduce a la formación de la nitrosilmioglobina (NOMB), que es el pigmento responsable de la coloración rojiza del jamón curado al corte, tan apreciada y tenida en cuenta por los consumidores en el momento de la compra del mismo. Ello requiere la presencia de los nitritos, los cuales generan el monóxido de nitrógeno (NO), que en condiciones reductoras, ya sea por vía directa combinándose con la mioglobina (Mb) o por vía indirecta en combinación con metamioglobina (MetMb), dan lugar a la NOMB. Ésta es muy estable, por lo que se mantiene incluso en los jamones de muy larga duración (como los ibéricos) (Cordoba *et al.*, 1994).

Finalmente, también estaría el efecto beneficioso del nitrato en el sabor de los productos cárnicos sobre los que se incorpora. Esto se ha atribuido al papel antioxidante del nitrito estabilizando los lípidos de membrana y bloqueando el efecto oxidante del hierro, de forma que se desvía o atenúa la degradación lípido-oxidativa de los ácidos grasos, formándose menos compuestos volátiles derivados de lípidos como hexanal, y aumentando los niveles de compuestos volátiles relacionados con el flavor “a curado” como el 2-metilbutanal y el 3-metilbutanal (Toldrá *et al.*, 2009).

El nitrito también presenta inconvenientes ya que puede dar lugar a nitrosaminas al reaccionar con las distintas aminas secundarias presentes en los aminoácidos que forman parte de las proteínas del alimento (Ventanas *et al.*, 2004). Y es que el nitrito es precursor del monóxido de nitrógeno, principal agente implicado en la nitrosación. Esta reacción se da en condiciones de alta temperatura y acidez extrema, como sucede en el estómago humano durante la digestión. Además, al cocinar a altas temperaturas productos cárnicos con nitritos añadidos también se pueden formar nitrosaminas, aunque en este caso se producen en menor proporción que durante el proceso de digestión. El problema de las nitrosaminas es que son compuestos altamente tóxicos y, desde los años 80, está demostrada su relación con la génesis del cáncer gástrico (Bartsch y Montesano, 1984). Por otro lado, se sabe que los nitritos en sangre oxidan el hierro de la hemoglobina produciendo metahemoglobinemia, molécula incapaz de transportar el oxígeno. Altas concentraciones de metahemoglobina pueden acarrear graves trastornos cardíacos y respiratorios, e incluso producir la muerte por cianosis (coloración azul por falta de oxígeno). Este suceso es más frecuente en bebés expuestos a altas concentraciones de nitratos en los alimentos debido a la menor acidez de su estómago y a la existencia de un cierto déficit del sistema enzimático que reduce la metahemoglobina, que sin embargo es muy eficaz en los adultos (De Fernícola, 1989).

Aunque recientemente los expertos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) han confirmado la seguridad de los nitratos y nitritos que se añaden a los alimentos como el jamón (EFSA, 2017), el mismo estudio indica que si se consideran todas las fuentes de nitritos y nitratos en la dieta (aditivos alimentarios, presencia natural en los alimentos vegetales y contaminantes ambientales en el agua) (Figura 1.1), se puede superar el nivel seguro (Tabla 1.1) en individuos de todas las edades con una exposición media a alta (EFSA, 2017).

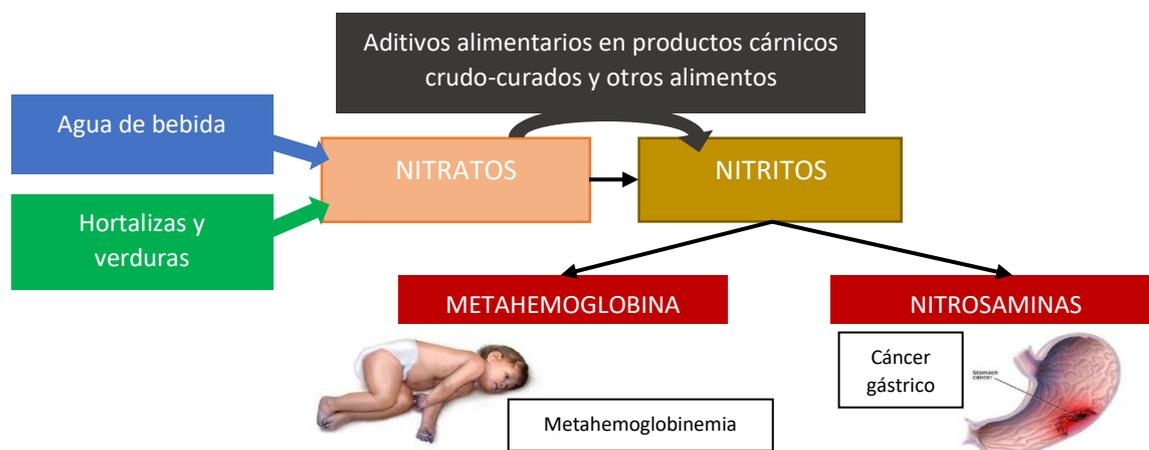


Figura 1.1: Vías de exposición humana a nitratos y nitritos con sus posibles efectos en el organismo

Tabla 1.1: Valores vigentes de Ingesta Diaria Admisible (IDA) para nitratos y nitritos en miligramos por kg de peso corporal y por día (EFSA, 2017)

	European Commission's former Scientific Committee for Food (SCF) (1997)	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2002)
Nitrates	3.7 mg/kg-bw/day	3.7 mg/kg-bw/day
Nitrites	0.06 mg/kg-bw/day	0.07 mg/kg-bw/day

De este modo, las limitaciones de seguridad impuestas a los nitratos y nitritos están basadas en la necesidad de minimizar o reducir el uso de estos compuestos como aditivos alimentarios. Por tanto, las estrategias encaminadas a la búsqueda de alternativas, a la vez que manteniendo las propiedades de los alimentos y los hábitos de los consumidores, resultan de gran interés.

1.3 La zinc protoporfirina (ZnPP) como agente de curado

Dentro de las posibles funciones tecnológicas que pueden tener los distintos compuestos obtenidos a partir co-productos y subproductos de origen animal, las relativas a la formación y estabilidad del color tienen especial interés puesto que éste es determinante en las decisiones de compra. Y es que, como consumidores, no podemos obviar la relevancia que tiene la calidad organoléptica a la hora de elegir un producto alimenticio u otro.

En la NOMb que se forma durante el curado del jamón con agentes nitrificantes, el color rojo se debe a la ferroporfirina presente en ésta, o más comúnmente llamada grupo hemo. El grupo hemo es el ejemplo más conocido de ferroporfirina y está presente como grupo prostético en la mioglobina, la hemoglobina y muchos citocromos (Armstrong y Bennett, 1982). Gracias a él, la mioglobina es una proteína transportadora de oxígeno en el músculo, donde actúa como reserva de oxígeno además de facilitar la difusión de éste a través de las células. El grupo hemo se caracteriza por tener un ion Fe^{2+} (ferroso) en el centro de un gran heterociclo orgánico llamado protoporfirina IX, hecho de cuatro grupos pirrólicos (tetrapirrol) unidos entre sí por medio de puentes metino. Sería por tanto una **ferro(II) protoporfirina IX** y su estructura química aparece dibujada en la figura 1.2:

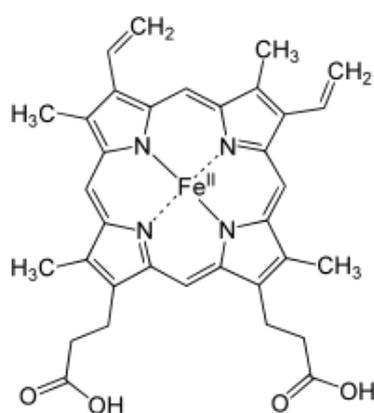


Figura 1.2: Estructura química del grupo hemo

En general, se consideraba que las ferroporfirinas como el grupo hemo de la mioglobina eran las únicas responsables del característico color rojo natural de los productos cárnicos (Pérez y Robles, 2000). Sin embargo, recientemente se ha identificado a otra molécula conocida como **zinc protoporfirina (ZnPP)**, como el pigmento responsable del color característico de un tipo de jamón en cuya producción no se añaden agentes de curado como nitratos y nitritos. Es el

llamado Jamón de Parma, un producto típico de la región italiana terre matildiche, que se extiende desde la vía Emilia hasta el río Enza. Es célebre en todo el mundo y se distingue por sus características nutricionales y por la corona, el sello que viene impreso a fuego en las piezas originales (PROSCIUTTO DI PARMA, 2019), tal y como se observa en la figura 1.3.



Figura 1.3: Jamón de Parma y logotipo de la marca protegida con denominación de origen

La producción tradicional de este jamón se basa solamente en usar sal marina, secar y dejar madurar las piezas durante un año. A pesar de no haber añadido nitratos ni nitritos, el color resultante sigue siendo rojo y resulta extremadamente estable frente a la exposición del jamón a la luz o al calor. El color es similar al de la NOMb, aunque algo menos intenso y más anaranjado-marrón (Lorés *et al.*, 2012). Este producto tan peculiar es la prueba de que es posible producir jamones curados en ausencia de nitritos y nitratos sin afectar a la seguridad alimentaria o a la calidad sensorial.

Químicamente, la ZnPP es un pigmento prácticamente similar al grupo hemo con la salvedad de que el átomo de hierro del anillo porfirínico ha sido sustituido por un átomo de zinc. Además, a diferencia del grupo hemo, el complejo ZnPP presenta una gran fluorescencia y es fácilmente detectable en pequeñas cantidades. Su nombre completo sería la **zinc(II) protoporfirina IX** y su estructura aparece representada en la figura 1.4.

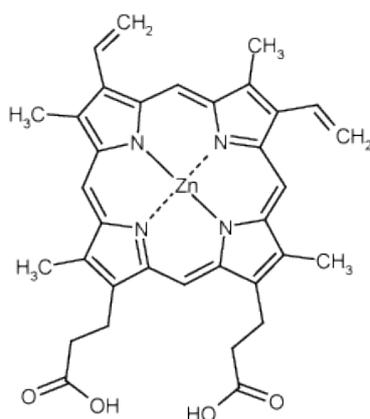


Figura 1.4: Estructura química de la Zinc(II) Protoporfirina IX

No fue hasta 2003 cuando Wakamatsu y su grupo de investigación, al realizar un estudio detallado sobre los pigmentos que se encontraban en el Jamón de Parma, concluyeron que el color rojo era causado por esta variante de la ferroprotoporfirina (Wakamatsu *et al.*, 2003).

En un trabajo posterior, los mismos investigadores determinaron que, bajo condiciones anaeróbicas y en presencia de microorganismos y enzimas endógenas propias de la carne, se formaba la ZnPP (Wakamatsu *et al.*, 2004).

Años después, vieron que la formación de ZnPP no estaba dada por la sustitución de zinc en el grupo hemo, sino por la inserción de este átomo dentro de la protoporfirina IX, la cual se forma de manera independiente. Por tanto, se puede decir que la formación de ZnPP está fuertemente influenciada por la formación de protoporfirina IX. Ésta sería la forma precursora del pigmento y no el grupo hemo (Wakamatsu *et al.*, 2007).

Posteriormente, Benedini *et al.* (2008), determinaron que la carne fresca contiene una actividad enzimática que promueve la formación de ZnPP en presencia de los sustratos zinc y protoporfirina IX. Ya se comenzaba a intuir que esta actividad se tenía que deber a una enzima tipo zinc-quelataza cuyo comportamiento se ajustaba a las condiciones químicas de los procesos de curado en seco.

Unos años más tarde, se determinó que el NO producido a partir del nitrito inhibe la formación de protoporfirina IX, precursora de la ZnPP. Por esta razón la ZnPP apenas puede formarse en productos cárnicos curados con nitratos y nitritos (Wakamatsu *et al.*, 2010).

Aún se requiere más investigación sobre este compuesto porque el estudio de la formación de ZnPP es relativamente novedoso. Sin embargo, debido a sus características de color y estabilidad frente a la luz y el calor (Morita *et al.*, 1996; Adamsen *et al.*, 2004), existe un creciente interés tecnológico en conocer este pigmento similar a las ferroporfirinas y determinar cómo implementarlo y comercializarlo en el sector de los productos cárnicos, tanto curados como frescos.

1.4 La ferroquelataza (FeQ) como enzima formadora de ZnPP y el hígado como fuente para obtenerla

Aunque los mecanismos relativos a la formación de ZnPP por parte de enzimas endógenas no han sido completamente elucidados, estudios recientes muestran que la enzima **ferroquelataza (FeQ)** es la principal responsable de la formación de la ZnPP (Chau *et al.*, 2010; Chau *et al.*, 2011).

La FeQ es una enzima presente en las células eucariotas (mitocondrias) y procariotas (membrana plasmática) que inserta el Fe^{2+} sobre la protoporfirina IX en el paso final de la biosíntesis del grupo hemo (UNIPROT, 2019) (Figura 1.5). Es una proteína sensible a los efectos de metales pesados (especialmente plomo) y, por supuesto, a la falta de hierro. En este último caso es cuando se ha visto que puede incorporar Zn^{2+} en lugar de hierro, formando el complejo zinc (II) protoporfirina IX. Además, por esa sensibilidad al plomo y a la ausencia de hierro, la medida de la ZnPP en los glóbulos rojos ha resultado ser útil en numerosas ocasiones para detectar envenenamientos con plomo o deficiencias de hierro en sangre (Verschoor *et al.*, 1987; Martin *et al.*, 2004; Crowell *et al.*, 2006). Más recientemente, la ZnPP está encontrando incluso un nuevo uso como fármaco en terapias combinadas contra el cáncer (Rouhani *et al.*, 2014).

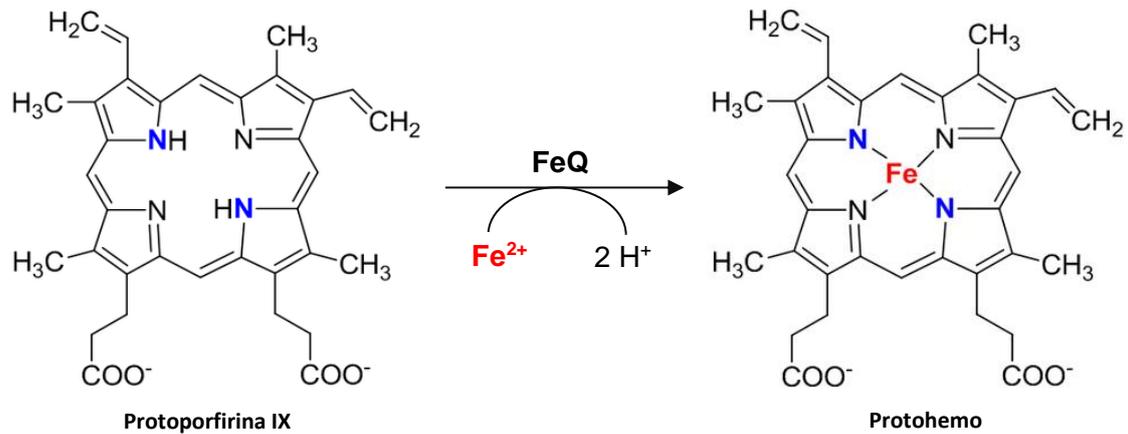


Figura 1.5: Reacción catalizada por la ferroquelatasa (FeQ) en presencia de hierro

Por otra parte, durante muchos años los investigadores se han limitado a estudiar la formación de ZnPP en el músculo esquelético del cerdo. Sin embargo, ultimamente se están buscando fuentes alternativas donde encontrar el pigmento. Por ejemplo, De Maere *et al.* (2017) han estudiado ocho fuentes de carne (pollo, pavo, cerdo, cordero, ternera, ternera, caballo e hígado de cerdo) para encontrar diferencias en el pH, la formación de metamioglobina, la cantidad de grupo hemo total, la actividad ferroquelatasa y otros parámetros que pueden afectar a la formación in vitro de ZnPP.

Gracias a otro estudio del grupo de Wakamatsu, el hígado de cerdo ha demostrado ser, sin duda, la fuente más interesante para obtener el pigmento (Wakamatsu *et al.*, 2015). En dicho trabajo se investigaron las propiedades formadoras de ZnPP de varios órganos internos de cerdo y pollo (hígado, corazón, riñón, bazo, etc.). Los valores óptimos de pH fueron diferentes entre los órganos y las propiedades de los órganos porcinos resultaron ser mejores que las de pollo. De entre todos los órganos porcinos, el hígado demostró la mayor capacidad enzimática para formar ZnPP e incluso a un valor de pH menor que en el músculo esquelético. Además, a diferencia del músculo, el oxígeno en el hígado no parece inhibir la formación de ZnPP. Por todo ello, el hígado parece ser el co-producto cárnico más interesante para la obtención de este pigmento.

Alternativamente a la obtención del pigmento ya formado, también se podría obtener la enzima FeQ o una fracción mitocondrial rica en ella por centrifugación diferencial (Graham, 2001; Taketani y Tokunaga, 2005) para después desarrollar la ZnPP in vitro o directamente sobre el producto. Esto tendría la ventaja de poder asegurar un mejor control de las condiciones de formación del pigmento de cara a su comercialización.

Ishikawa *et al.* estudiaron la formación in vitro de la ZnPP a partir de la enzima extraída del corazón de cerdo (2006). Sin embargo, todavía no existe un estudio cuyo objetivo se centre en optimizar la extracción de la FeQ a partir del hígado de cerdo con el fin de obtener posteriormente ZnPP en condiciones de seguridad. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un método eficaz y rentable que permita obtener una fracción con elevada actividad FeQ a partir del hígado de cerdo.

1.5 Los ultrasonidos de potencia (USdP) para la intensificación de procesos de extracción

Los ultrasonidos son ondas acústicas que poseen una frecuencia superior a 20 kHz, donde se sitúa el umbral de audición del oído humano. Como cualquier onda, poseen tres parámetros principales que los caracterizan: intensidad o amplitud, frecuencia y velocidad. Así, se pueden distinguir por un lado los ultrasonidos de señal, también conocidos como de baja intensidad o de alta frecuencia, y por otro lado los ultrasonidos de potencia (USdP), que poseen alta intensidad o baja frecuencia (Tabla 1.2). Las aplicaciones de los ultrasonidos de señal se basan en que algunos de los parámetros que caracterizan la onda ultrasónica varían en función de las propiedades físicas del medio que atraviesa, lo cual nos permite extraer información útil de éste. Los USdP se utilizan, sin embargo, para provocar cambios o acelerar la cinética de transferencia de materia y calor durante un determinado proceso (secado, congelación, fermentación, cristalización...) (Awad *et al.*, 2012).

Tabla 1.2: Tipos de ultrasonidos y características diferenciales

Tipo de ultrasonidos	Intensidad	Frecuencia	Aplicaciones	Modo de aplicación más común
<u>De señal</u>	Baja (< 1 W/cm ²)	Alta (100 kHz-20 MHz)	- Control de procesos - Caracterización o análisis no destructivo de materiales	Pulsada
<u>De potencia (USdP)</u>	Alta (> 1 W/cm ²)	Baja (20 kHz-100 kHz)	- Mejora o intensificación de procesos - Modificación de materiales	Continua

En este sentido, los USdP también se han utilizado para facilitar la extracción de diversos compuestos de interés como por ejemplo péptidos bioactivos a partir de diferentes fuentes celulares (Kadam *et al.*, 2015). Mediante la aplicación de estos ultrasonidos se produce una mejor penetración del disolvente en la matriz celular, una alteración de la estructura y por tanto una mejora en la transferencia de la materia (Mason, 1998). Este hecho se debe a que durante el tratamiento de muestras líquidas con esta técnica se producen efectos rápidos y sucesivos de rarefacción y compresión. A frecuencias adecuadas, los ciclos de rarefacción exceden a las fuerzas de atracción de las moléculas de agua, formándose burbujas de cavitación a partir de un núcleo gaseoso presente en la muestra. Estas burbujas se distribuyen por todo el líquido y aumentan de tamaño hasta que finalmente colapsan (Feng, 2002; Shukla, 1992). La explosión de estas burbujas produce acumulaciones de energía en determinados puntos, generando temperaturas y presiones extremas que producen altas tensiones de ondas de energía y turbulencia en la zona de cavitación, lo que origina unos esfuerzos cortantes muy elevados capaces de romper las células liberando su contenido al exterior (Patist y Bates, 2008).

El interés en el desarrollo de las extracciones asistidas con esta técnica recae en la posibilidad de reducir el tiempo de extracción al mismo tiempo que se aumenta el rendimiento (Dolatowski *et al.*, 2007). Además, en algunos casos incluso podrían sustituirse los solventes orgánicos normalmente empleados para las extracciones, por otros solventes reconocidos generalmente como seguros o “GRAS” (FDA, 2019), lo que reportaría beneficios económicos y medioambientales en términos de salud y seguridad alimentaria (Vilkhu *et al.*, 2008).

Esta tecnología ha demostrado ser útil en la extracción de numerosos compuestos (Chemat *et al.*, 2017; Tsiaka *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2016), incluyendo enzimas (Amid *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015; Szabo *et al.*, 2015). Sin embargo, la extracción asistida por USdP de la

FeQ no ha sido abordada previamente. Usando determinados niveles de energía ultrasónica se podría favorecer la transferencia de la enzima desde el hígado al medio líquido sin llegar a afectar a su estructura. Optimizando este proceso se lograría incrementar la velocidad y el rendimiento de extracción de la FeQ, con el consecuente ahorro de tiempo y solvente.

Por otra parte, aunque no es objetivo del presente estudio, la aplicación de ultrasonidos a una menor potencia podría utilizarse para incrementar la actividad de la FeQ en la formación de ZnPP. Y es que es ampliamente conocida la habilidad de los ultrasonidos para favorecer la actividad enzimática si las condiciones de aplicación son las adecuadas (Nadar y Rathod, 2017; Delgado-Povedano y De Castro, 2015; Bansode y Rathod, 2017).

A la hora de aplicar los USdP, se requieren tres elementos fundamentales: generador, transductor y emisor. El generador transforma la señal eléctrica de la red a la frecuencia deseada. El transductor convierte la señal eléctrica de alta frecuencia en vibraciones mecánicas. El último elemento, el emisor, irradia la energía acústica producida por el transductor al medio a tratar (García-Pérez, 2007). Los sistemas de aplicación de USdP son diferentes según se apliquen sobre medios líquidos o gaseosos. Centrándonos en los medios líquidos, donde se desarrollan la mayoría de las extracciones enzimáticas, destacan principalmente los baños de ultrasonidos y los sistemas tipo sonda. Los baños de ultrasonidos posiblemente sean la aplicación más popular de los USdP y, aunque normalmente se usan como equipos de limpieza de material de laboratorio, existen numerosos casos en los que se han utilizado para acelerar los procesos de transferencia de materia en medios líquidos (Mason, 1998). Sus principales limitaciones son: la poca potencia que suministran al medio si se comparan con otros sistemas, la variación del campo acústico dentro del baño y la dificultad en el control de la temperatura. Los sistemas de tipo sonda son, sin embargo, aquellos en los que se utiliza una sonda metálica para aplicar al medio líquido la vibración generada en el transductor. La potencia aplicada dependerá de la amplitud de vibración en la punta de la sonda, la cual se controlará variando la potencia eléctrica suministrada por el generador. El inconveniente de esta configuración es que el material utilizado para la fabricación de las sondas debe tener una alta resistencia a la fatiga, soportar la erosión provocada por la cavitación en la punta de la sonda y ofrecer bajas pérdidas acústicas (García-Pérez, 2007).

Los procedimientos de extracción suelen tener una fase de calentamiento y/o agitación donde se consiguen liberar los compuestos de interés. Es en esta etapa donde se deben de aplicar los USdP para intensificar el proceso. Gracias a esto, la energía generada con el colapso de las burbujas de cavitación favorece la penetración del solvente y el intercambio de materia, a la vez que incrementa la temperatura de la muestra y provoca una constante agitación de la misma. De esta manera, se logran las condiciones necesarias para extraer el compuesto de interés de las células a la vez que se mejora el rendimiento del proceso de recuperación y se reduce el tiempo necesario para ello. Por tanto, los USdP surgen como una opción barata, reproducible, simple y eficiente para mejorar el rendimiento y acelerar o intensificar los procesos de extracción (Soria y Villamiel, 2010; Medina-Torres *et al.*, 2017).

El trabajo que aquí se presenta es por tanto una primera incursión en la aplicación de dicha técnica para optimizar la extracción de la FeQ a partir del hígado de cerdo, con el fin de obtener una fracción enzimática capaz de ser utilizada posteriormente en el desarrollo del color de los productos cárnicos sin agentes nitrificantes añadidos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la viabilidad del uso de ultrasonidos de potencia (USdP) para mejorar la extracción de la ferroquelatasa (FeQ) a partir del hígado de cerdo. Para ello, se partió de la hipótesis de que los USdP podrían mejorar el rendimiento de extracción de dicha enzima en medio líquido gracias a sus efectos mecánicos. Con la extracción asistida por ultrasonidos se buscó lograr un aumento en la concentración de enzima extraída y una reducción en el tiempo del proceso respecto a la extracción convencional. Así, se intentaron determinar las condiciones óptimas de extracción del enzima utilizando un sistema ultrasónico tipo sonda y variando tanto el tiempo de aplicación de los ultrasonidos como la frecuencia de aplicación de los mismos.

Además, con este estudio se persiguieron otros objetivos secundarios como:

- Valorizar el hígado de cerdo, un importante co-producto de la industria cárnica.
- Contribuir al desarrollo de productos cárnicos sin nitratos y nitritos añadidos.
- Profundizar en el conocimiento de la enzima FeQ como enzima formadora del pigmento ZnPP.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

La materia prima utilizada fueron hígados de cerdos procedentes del matadero "Carnes de Teruel" (PORTESA, 2019). Los animales eran cerdos con garantía de calidad *Denominación de Origen* (D.O. Jamón de Teruel) y cumplían con todos los requisitos legales y sanitarios según el Real Decreto 1749/1998 (BOE 07/08/1998). Una vez en el laboratorio, los hígados frescos se trituraron para su homogenización, se envasaron en bolsas de vacío de 30 g y éstas fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

3.2 Protocolo

El protocolo para extraer la enzima ferroquelatasa a partir de los hígados y evaluar la actividad enzimática de la fracción extraída está basado en el trabajo desarrollado por Polarari *et al.* (2009) con la diferencia de que ellos partieron de músculo de cerdo y no de hígado. El procedimiento consta de 3 partes: ***extracción de la enzima, reacción enzimática y cuantificación del producto de la reacción.***

3.2.1 Extracción de la enzima

La primera parte del protocolo fue la extracción de la ferroquelatasa a partir del hígado de cerdo. Para ello, se partió de 4 g de hígado triturado procedente de una de las bolsas descongeladas a temperatura ambiente. La muestra de hígado se homogeneizó (Homogenizer DI 25 Basic, IKA, Germany) con 100 mL de buffer de extracción a 4°C durante 1 min, aplicando 8000 rpm para no generar demasiada espuma. El buffer de extracción se compone de: Tris-HCl 50 mM, Glicerol 20% (w/v), KCl 0,8% (w/v) y Triton X-100 1% (w/v), y fue ajustado a pH=8 con NaOH. Una vez añadidos todos los reactivos, se procedió a la fase de extracción de la enzima contenida en las células hepáticas. Es aquí donde se llevaron a cabo dos modalidades de extracción diferentes:

A. EXTRACCIÓN CONVENCIONAL.

En esta modalidad, la muestra homogeneizada se sometió a agitación durante 30 min empleando un agitador magnético (Magnetic Stirrer Hot Plate SM3, STUART, UK), tal y como se muestra en la Figura 3.1:



Figura 3.1: Montaje experimental para la extracción convencional

La agitación se llevó a cabo dentro de una nevera a $4\pm 2^\circ\text{C}$, lo cual permitió mantener las condiciones de frío necesarias para no afectar a la enzima.

B. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS.

Como alternativa a la extracción convencional se probó a realizar la extracción aplicando ultrasonidos con un dispositivo tipo sonda (UP400S ultrasonic processor, HIELSCHER, Germany) a la máxima potencia (400 W) variando tanto el tiempo de aplicación (1, 2.5 y 5 min) como el modo de aplicación (continua vs pulsada). La diferencia entre aplicación continua y pulsada consistió en que, mientras en la primera se aplicaron los ultrasonidos de forma continuada, sin interrupciones, en la segunda se aplicaron con una frecuencia de pulsos de 0.5. Es decir, el sonicador aplicaba ultrasonidos durante medio segundo y después pausaba durante otro medio segundo. El montaje experimental se muestra en la figura 3.2:

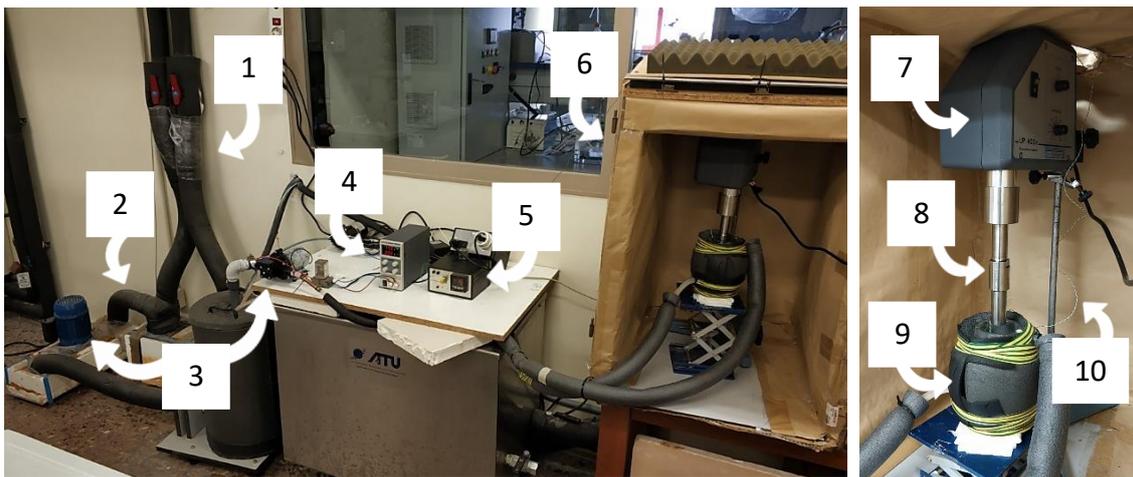


Figura 3.2: Montaje experimental para la extracción asistida por ultrasonidos.

(1) Conducciones de líquido refrigerante (2) Intercambiador de placas (3) Bombas hidráulicas (4) Fuente de alimentación (5) Controlador de temperatura (6) Caja aislante para reducir el ruido de la sonicación (7) Generador de ultrasonidos (8) Sonotrodo (9) Vaso refrigerado con la muestra de hígado (10) Sonda de temperatura.

En este caso, el control de la temperatura es más crítico ya que la cavitación que generan los ultrasonidos sobre las moléculas del líquido provoca un rápido aumento de la temperatura. Para evitar llegar a temperaturas elevadas capaces de desnaturalizar la enzima se empleó el sistema de refrigeración mostrado arriba. En este sistema, se recircula agua glicolada (1) mediante bombas hidráulicas (3) a través de un intercambiador de placas (2) para que se enfríe (-15°C) y pase después a través de las paredes del vaso que contiene la muestra (9). Es dentro de este vaso donde se sitúa el sonotrodo (8) que emitirá los ultrasonidos generados (7). Con la ayuda de un termopar de tipo-K (10) se vigila en todo momento la temperatura de la muestra y en función de ello se realiza un control ON-OFF actuando sobre la bomba (3) que recircula el líquido refrigerante.

Finalizado el proceso de extracción, la muestra se centrifugó durante 10 min a 12.500 rpm y 4°C (Medifriger BL-S, SELECTA, Spain). El sobrenadante obtenido fue filtrado a continuación (Whatman 597, GE LIFE SCIENCE, USA).

3.2.2 Reacción enzimática

En esta segunda parte, se llevó a cabo la reacción enzimática *in vitro* a partir de la fracción extraída, centrifugada y filtrada en la fase anterior. El conjunto de reactivos utilizados para ello se detallan a continuación:

- Fuente de zinc: ZnSO_4 400 μM en buffer Tris-HCl 360 mM, y todo ello ajustado a pH=8.0
- Fuente de protoporfirina: Protoporfirina IX 0,25 mM en buffer Tris-HCl 360 mM, y todo ello ajustado a pH=7.0
- Solución de ATP 25 Mm en NaCl al 20% (w/v)
- EDTA 50 Mm

A partir de estos sustratos se prepararon 3 lotes para la reacción: **muestras, blancos y controles**, tal y como se representa en la tabla 3.1:

Tabla 3.1: Combinación de reactivos para cada grupo

	Fracción enzimática extraída del hígado	Zinc	Protoporfirina	ATP	EDTA
Muestras (M)	✓	✓	✓	✓	✗
Blancos (B)	✗	✓	✓	✓	✓
Controles (C)	✓	✓	✓	✓	✓

- El lote de los **blancos** es aquel en el que no se pone extracto de hígado y por tanto no habrá reacción enzimática.
- Por otro lado, el lote de los **controles** es aquel grupo en el que si que se pone extracto de hígado y por tanto existe la enzima, pero la reacción no tiene lugar debido al EDTA añadido (éste actúa como agente quelante del zinc, inhibiendo la reacción).
- Por último, el lote de las **muestras** es aquel que va a llevar a cabo la reacción ya que contiene el extracto enzimático y no contiene EDTA.

La reacción se desarrolla en microtubos dentro de un baño a una temperatura constante de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Los microtubos se incubaron a diferentes tiempos para así después obtener una cinética de la reacción. Los tiempos ensayados fueron: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 105 y 120 min. Antes de llevar a incubar los microtubos, el orden de adición de los reactivos fue el siguiente:

- 1º) 35 μL de EDTA → solo en los **blancos y controles**, no sobre las muestras (excepto en las muestras del tiempo 0, que sí lo llevan para impedir el comienzo de la reacción).
- 2º) 250 μL de ZnSO_4
- 3º) 200 μL de ATP
- 4º) 50 μL de Protoporfirina IX
- 5º) 300 μL del extracto de hígado → solo en las **muestras y controles**, no en los blancos.

En la figura 3.3 se muestra el montaje experimental utilizado para el control de la temperatura del baño:

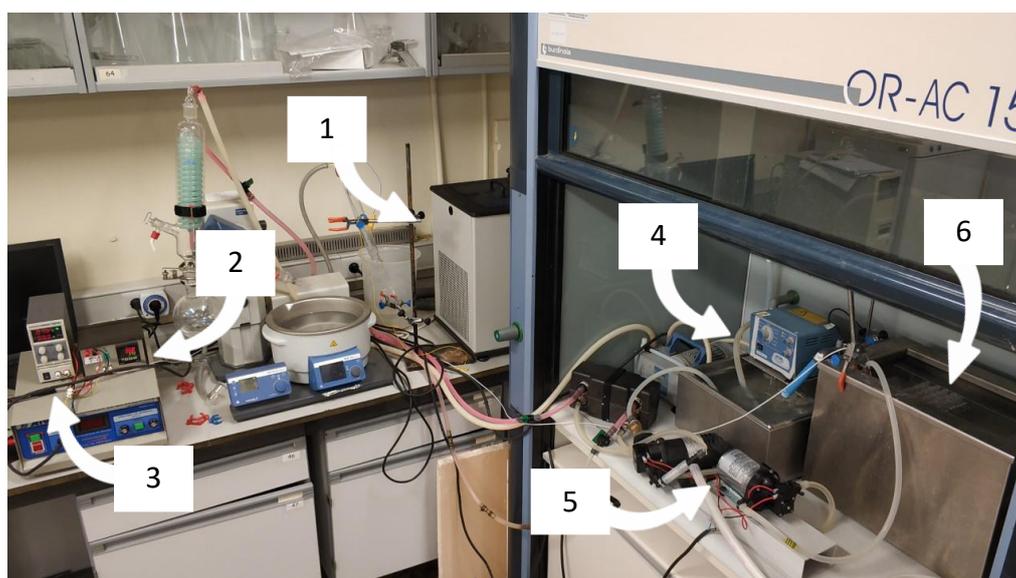


Figura 3.3: Equipo empleado para el desarrollo de la reacción enzimática.

(1) Equipo refrigerador (2) Controlador de temperatura (3) Fuente de alimentación (4) Equipo calefactor (5) Bombas hidráulicas (6) Baño a 37°C con la gradilla de microtubos.

La temperatura del baño donde se llevó a cabo la reacción enzimática (6) se mantuvo prácticamente constante a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ durante los 120 min del proceso gracias al suministro de agua por dos equipos diferentes. El primero de ellos es el equipo calefactor (4), el cual consiste en un baño termostático con agua a $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$. El segundo de ellos es el equipo refrigerador (1), el cual contiene agua a $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$. El aporte de agua por ambos equipos, impulsado por las bombas hidráulicas (5), fue coordinado gracias al controlador de temperatura (3).

A cada uno de los tiempos escogidos se fueron retirando del baño los microtubos correspondientes y situándolos inmediatamente en hielo. Las réplicas del lote de las **muestras** recibían además 35 μL de EDTA para detener la reacción. A continuación, se añadía etanol absoluto frío y se centrifugaban los microtubos durante 30 minutos a 13.200 rpm y 4°C (Centrifuge 5415R, EPPENDORF, Germany).

3.2.3 Cuantificación del producto de la reacción

En esta tercera y última parte del procedimiento se llevó a cabo la lectura del producto de la reacción enzimática. Dicho producto es la zinc-protoporfirina (ZnPP), pigmento con capacidad fluorescente (a diferencia de la mioglobina y la nitrosilmioglobina) cuyos picos de excitación y

emisión se sitúan en torno a 420 nm y 590 nm, respectivamente (Wakamatsu *et al.*, 2004). Las medidas de fluorescencia se realizaron en un fluorímetro de placas de 86 pocillos ajustado a dicho rango (Infinite 200 Microplate Reader, TECAN, Switzerland). El equipo aparece mostrado en la figura 3.4:



Figura 3.4: Equipo empleado para la lectura del producto de la reacción

Para conocer la concentración de ZnPP (μM) presente en cada microtubo a partir de los valores de fluorescencia obtenidos, fue necesario hacer una recta de calibrado. Para ello se partió de una solución comercial de ZnPP concentrada (Sigma-Aldrich) y se realizaron diluciones en el rango de 0 μM - 18 μM sobre buffer de extracción. La recta de regresión obtenida aparece representada en la figura 3.5.

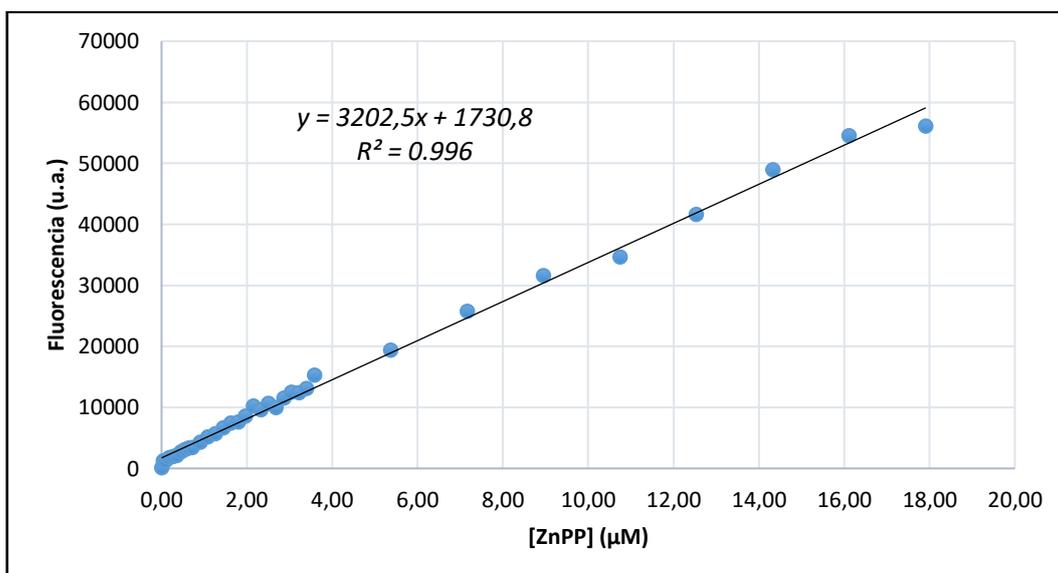


Figura 3.5: Recta de calibrado fluorescencia vs concentración ZnPP

La relación lineal resultante ($R^2 = 0.996$) permitió determinar la concentración de ZnPP formada en cada microtubo a partir de los valores de fluorescencia obtenidos.

3.3 Análisis de resultados

Con los datos de concentración de ZnPP formada a los diferentes tiempos se procedió a obtener la velocidad de reacción expresada como la velocidad de formación del producto ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$), uno de los parámetros característicos de una reacción enzimática (Fersht, 1984). Tal y como aparece en la Ecuación 1, la velocidad a la cual se forma el producto se puede definir como la cantidad de producto formado por unidad de tiempo.

$$r = \frac{d[P]}{dt} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

- $d[P]$ es la variación en la concentración de producto ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L}$).
- dt es la variación en el tiempo (min).

Por tanto, representando P vs t podemos calcular r en un determinado tramo a través de la pendiente de la curva en dicho tramo, asumiendo que el sustrato está en exceso y no influye en la velocidad de reacción de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten.

Con el fin de comparar los resultados obtenidos en este trabajo frente a otros trabajos similares de la bibliografía, los valores de velocidad fueron también expresados en forma de actividad enzimática específica (AEE) ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{\text{h} \times \text{mg hígado}}$).

Además, si se considera que la velocidad de reacción r obtenida es la máxima posible podemos expresarla como r_m ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$):

$$r_m = k_2 \times [E]_0 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

- k_2 es la constante cinética de disociación del complejo enzima-sustrato en enzima libre más producto formado durante la reacción ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{\mu\text{mol de enzima} \times \text{min}}$).
- $[E]_0$ es la concentración inicial de enzima ($\frac{\mu\text{mol de enzima}}{L}$).

Con este parámetro podremos comparar la eficacia de las extracciones realizadas en términos de concentración de enzima extraída. Para ello supondremos que los ultrasonidos no influyen en la posterior actividad de la enzima durante la reacción. Es decir, que no provocan cambios conformacionales en la proteína que luego puedan influir en la velocidad de reacción. Por tanto, supondremos que la k_2 es la misma entre las condiciones ensayadas, y entonces:

$$\frac{r_{m\text{CONDICIÓN 1}}}{r_{m\text{CONDICIÓN 2}}} = \frac{k_2 \times [E]_{0\text{CONDICIÓN 1}}}{k_2 \times [E]_{0\text{CONDICIÓN 2}}} = \frac{[E]_{0\text{CONDICIÓN 1}}}{[E]_{0\text{CONDICIÓN 2}}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Comparando las r_m obtenidas entre dos condiciones de extracción diferentes lograremos saber la relación entre la concentración de enzima inicial obtenida mediante una modalidad u otra.

Por último, para evaluar la significación estadística de las diferencias encontradas entre las variables estudiadas se realizaron análisis de la varianza (ANOVA multifactorial) y test de comparación múltiple LSD (Least Significant Difference) con un nivel de significación del 95% ($p < 0.05$). La variable respuesta o variable dependiente estudiada fue la *concentración de ZnPP* y los factores o variables independientes fueron: *tiempo de reacción enzimática* y *condición/modalidad de extracción de la enzima*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción convencional

En la figura 4.1 se muestra la cinética de reacción obtenida tras la extracción convencional empleando 30 min de agitación magnética (ver Apartado 3.2.1.A). La cinética de reacción representa la concentración de producto formado P ($\mu\text{M ZnPP}$) frente al tiempo t (min). Como se puede apreciar, a medida que avanza la reacción la cantidad de producto formado es cada vez mayor. La gráfica consta de 2 tramos diferenciados en los cuales varía la pendiente. El primer tramo va desde 0 hasta 15 min y es aquel en el que se observa una mayor pendiente. Esto se puede deber a una amplificación inmediata de la reacción al poner en contacto la enzima con el sustrato, o a otros efectos desconocidos, ya que considerando el modelo de Michaelis-Menten la evolución debería de ser lineal desde el principio. A partir de los 15 min, se observa una tendencia lineal hasta los 120 min. Durante este tiempo la enzima está saturada y trabaja a la velocidad máxima de la reacción generando una cantidad constante de producto por unidad de tiempo. Aunque no es el producto máximo que se puede obtener de la reacción, para realizar las comparaciones se consideró el producto formado a 120 min (**0.6961 $\mu\text{M ZnPP}$**) como el valor de producto máximo formado.

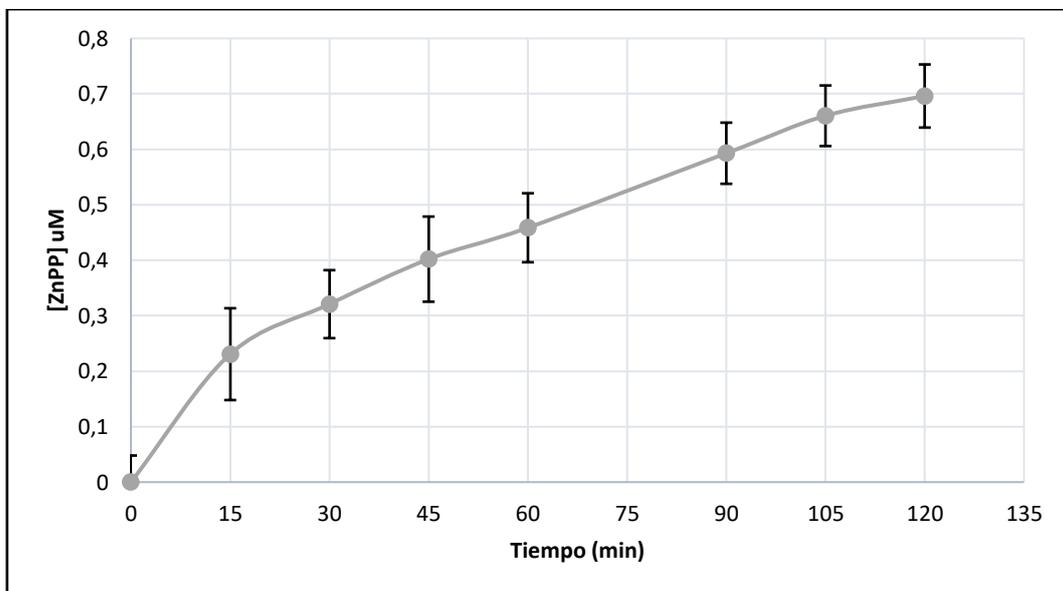


Figura 4.1: Cinética de reacción tras extracción convencional (30 min agitación); se muestran los valores medios \pm desviación típica

La velocidad de reacción (r) se calculó tanto para el primer tramo de la cinética (r_0) como para el segundo (r_p) a partir de las pendientes en dichos tramos. También se expresaron en forma de actividad enzimática específica (AEE). Los valores obtenidos aparecen mostrados en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica para la cinética de extracción convencional (30 min agitación)

	r_0 ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$)	r_p ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$)	AEE_0 ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{h \times \text{mg hígado}}$)	AEE_p ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{h \times \text{mg hígado}}$)
Agitación 30 min	0.0154	0.0047	0.5153	0.1561

Aunque el estudio de la actividad enzimática de la ferroquelatasa (FeQ) extraída del hígado de cerdo no ha sido abordado previamente, se pueden comparar los resultados obtenidos frente a otros trabajos similares que han extraído dicha enzima de otras fuentes.

Por ejemplo, Camadro *et al.* (1984) han caracterizado la actividad de la FeQ en el hígado humano mediante el estudio cinético de la enzima en condiciones iniciales de velocidad. La actividad enzimática específica que obtuvieron fue de $4.3 \frac{\text{nmol de ZnPP}}{\text{h} \times \text{mg hígado}}$, un valor **27.5** veces mayor que el obtenido en el trabajo aquí presentado ($0.1561 \frac{\text{nmol de ZnPP}}{\text{h} \times \text{mg hígado}}$).

Una de las posibles causas de esta diferencia se puede deber al zinc endógeno presente en las muestras. Y es que el grupo de Camadro enfatiza la importancia de la presencia de metales endógenos en las membranas mitocondriales, donde se encuentra la FeQ. Iones divalentes de estos metales (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ...) pueden actuar también como sustratos para la enzima e influir en las medidas de la actividad enzimática. Además, en un trabajo anterior ya demostraron a través de la FeQ de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la fuerte inhibición competitiva que genera el ion ferroso (Fe^{2+}) sobre la actividad zinc-quelatasa y cómo su presencia disminuye la capacidad formadora de ZnPP (Camadro y Labbe, 1982). Este hecho podría considerarse estimando la concentración de metales endógenos mediante métodos como el propuesto por Kato e Inoue (1981). Así, del mismo modo que Camadro *et al.* (1984) postularon que la capacidad de la FeQ para sintetizar ZnPP en el hígado humano podría depender del agotamiento de una reserva de hierro ferroso mitocondrial, en el hígado de cerdo podría suceder lo mismo. Además, no sólo los metales han demostrado poder interferir en la actividad FeQ, otros investigadores han confirmado la inhibición de ésta cuando hay un exceso del grupo hemo (Rossi *et al.*, 1990). Por otro lado, en otro trabajo se vio que la entrega de la protoporfirina IX a la FeQ es un factor regulador igualmente importante en el funcionamiento de la enzima y en el control de su actividad (Urban-Grimal y Labbe, 1981).

Otra posible causa de la variabilidad obtenida es no haber registrado la desaparición del sustrato protoporfirina IX, cuyas señales de emisión y excitación fluorescente son 634 y 410 nm, respectivamente. Esto hubiera permitido determinar si todo el producto formado es ZnPP o también se ha formado ferro-protoporfirina por la incorporación de hierro. Así pues, Camadro *et al.* (1984) observaron en su estudio de la FeQ humana de hígado una desaparición de protoporfirina IX concomitante, pero no igual, a la aparición de ZnPP, sugiriendo la quelación de al menos dos metales: zinc y hierro.

Otro aspecto a considerar es la reducción del ion ferroso endógeno en las mitocondrias de las muestras de hígado de cerdo. Esto se podría haber hecho empleando compuestos como la 2,2'-bipiridina, un quelante que reduce de manera específica el contenido ferroso mitocondrial sin afectar al zinc (Nunez *et al.*, 1983). Además, se ha visto que cuando se emplea a concentraciones bajas puede incluso aumentar la actividad zinc-quelatasa de la FeQ dando lugar a una mayor formación de ZnPP (Marcus *et al.*, 1982).

Por último, no se puede obviar el efecto de la variabilidad entre las muestras y es que estudios como el de Benedini y Palorari (2008) ponen de manifiesto la influencia que tienen los factores externos en los resultados de la actividad enzimática. Este grupo de investigación trabajó con músculo de cerdo y utilizó el protocolo de actividad enzimática sobre el que basamos el trabajo aquí presentado. El coeficiente de variación que obtuvieron alcanzó el 66%. Esto refleja la influencia que puede suponer la raza de los cerdos, la manera en la que son criados y alimentados, e incluso la técnica de transporte y sacrificio. Identificar todas las variables que

afectan a la actividad de la enzima sería crucial para comprender el mecanismo de formación de ZnPP y descubrir la causa final de las diferencias obtenidas.

4.2 Extracción asistida por USdP

En la figura 4.2, se presenta la cinética de reacción obtenida tras aplicar ultrasonidos a máxima potencia (400 W) de forma continuada durante 5 min. Esta fue la condición más agresiva de todas las ensayadas y sirvió de base para ver si existía una mejora frente a la extracción convencional (agitación 30 min).

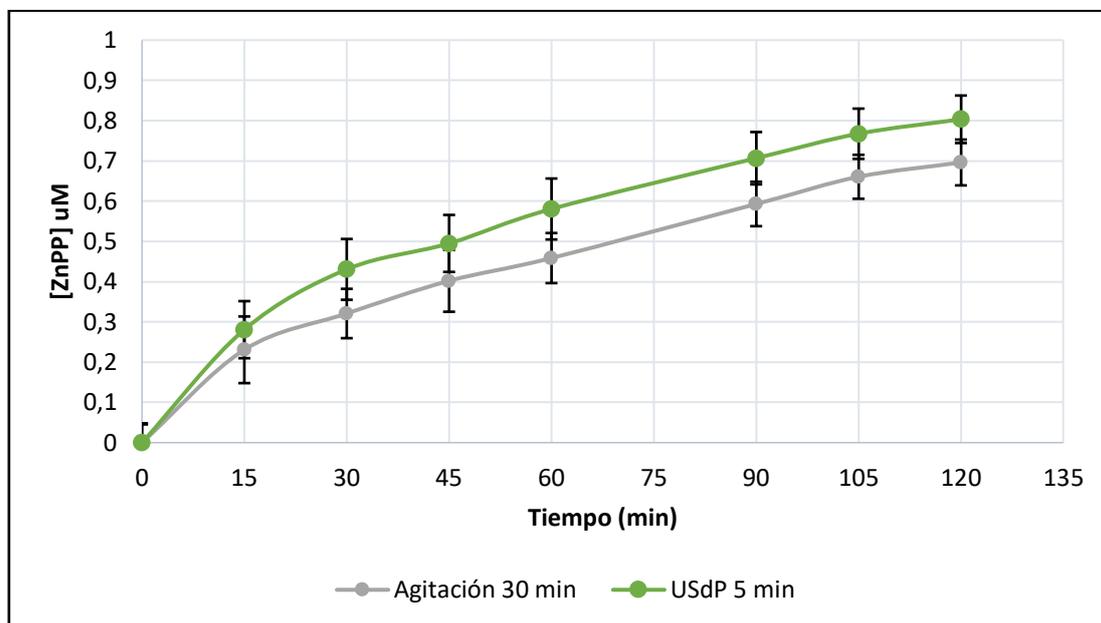


Figura 4.2: Cinética de reacción tras extracción asistida por USdP (5 min); se muestran los valores medios \pm desviación típica

Como se puede observar, la forma de la cinética de reacción de USdP 5 min sigue siendo la misma. Sin embargo, la cantidad de producto máximo formado es mayor (**0.8034 μM ZnPP**) y las pendientes de los tramos 1 y 2 son ligeramente más pronunciadas. Los valores de velocidad de reacción calculados a partir de dichas pendientes y las actividades enzimáticas específicas aparecen mostradas en la tabla 4.2. Comparando estos valores frente a los obtenidos en la cinética de extracción convencional se observa que la mayor diferencia reside en la pendiente del tramo 1, con una mejora del **21.6 %**. En el tramo 2 la diferencia es inferior y la mejora es tan solo del **7.5 %**. Respecto a la concentración de producto máximo formado el aumento ha sido del **13.4%**. Suponiendo que los ultrasonidos no han afectado a la estructura de la enzima y por tanto la constante de disociación k_2 no ha cambiado, podemos atribuir la causa de estas mejoras a una mayor cantidad de enzima participando en la reacción y por tanto una mayor cantidad de enzima extraída. En concreto, la concentración de enzima extraída mediante USdP 5 min fue **1.08** veces superior a la concentración de enzima extraída mediante agitación 30 min.

Tabla 4.2: Valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica para la cinética de extracción asistida por USdP (5 min)

	r_0 ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$)	r_p ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$)	AEE_0 ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{h \times \text{mg hígado}}$)	AEE_p ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{h \times \text{mg hígado}}$)
USdP 5 min	0.0187	0.0051	0.6575	0.1688

Tal y como se observa en la figura 4.3, el análisis estadístico indica que los dos factores analizados (*tiempo de reacción* y *condición aplicada*) son significativos ($p < 0.05$). Lógicamente, el primero de ellos influye sobre la concentración de ZnPP ya que, a mayor tiempo, mayor formación del pigmento. El segundo de ellos también ofrece significancia ya que el hecho de haber cambiado la modalidad de extracción ha dado lugar a una cinética de reacción cuyos valores de producto son significativamente ($p < 0.05$) mayores a los obtenidos tras la extracción convencional. La interacción entre ambos factores también es significativa ($p < 0.05$) ya que conforme aumenta el tiempo de reacción la cantidad de producto formado es mayor y por tanto las diferencias entre las condiciones son más evidentes.

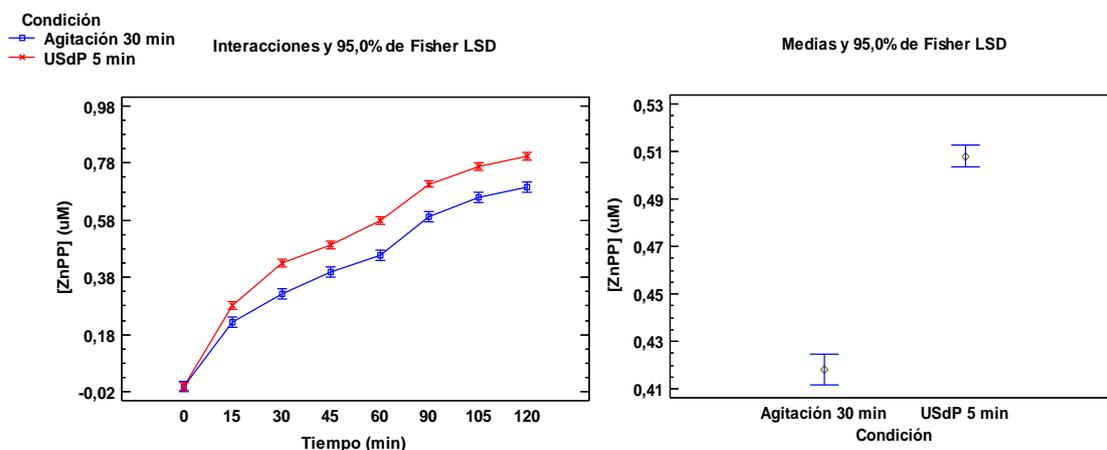


Figura 4.3: Análisis estadístico de la influencia de la aplicación de USdP (5 min); se muestran valores medios \pm intervalo de confianza LSD 95%

Todo ello se traduce en que la aplicación de USdP durante 5 min de forma continuada ha logrado una mejora significativa ($p < 0.05$) en la extracción de la enzima ferroquelatasa a partir del hígado de cerdo.

Los resultados obtenidos se han comparado con trabajos bibliográficos similares que han empleado los USdP para potenciar algún proceso de extracción enzimática.

Por ejemplo, Li *et al.* (2015) estudiaron los efectos de la extracción asistida por ultrasonidos sobre tres enzimas obtenidas mediante fermentación en estado sólido (SSF) con *Aspergillus japonicus*. Las enzimas extraídas fueron pectinasa, endoglucanasa y xilanasa. Las actividades máximas de dichas enzimas, medidas en $\mu\text{moles}/(\text{min} \times \text{g})$, se vieron incrementadas en un factor de **1.2**, **1.48** y **1.30**, respectivamente, un valor ligeramente superior al obtenido en este trabajo (**1.08**).

Por otro lado, Szabo *et al.* (2015) demostraron también que el uso de ultrasonidos podía ser altamente beneficioso en la extracción de diversas enzimas procedentes de una SSF con *Trichoderma virens*. Dependiendo de los parámetros de sonicación, las actividades enzimáticas de los extractos obtenidos se vieron aumentadas un 129-413% (**1.29-4.13**) respecto a las actividades originales medidas en los extractos recuperados convencionalmente mediante un agitador magnético.

Finalmente, cabe mencionar que no solamente existe el uso de USdP como mejora frente a la extracción convencional de agitación magnética. Nuevos métodos para la extracción y purificación de enzimas como el sistema de fraccionamiento en tres fases (TPP) han encontrado una interesante sinergia al combinarse con los ultrasonidos (UA-TPP) (Nadar *et al.*, 2017).

Trabajos como por ejemplo el que llevaron a cabo Avhad *et al.* (2014) para extraer la enzima fibrinolítica de *Bacillus sphaericus* ofrecen resultados más que prometedores en el uso de UA-TPP, con incrementos de hasta 7 veces en la pureza y actividad de las enzimas obtenidas. Además, otros estudios ponen de manifiesto, el efecto que tiene esa combinación con los ultrasonidos sobre el tiempo de proceso, permitiendo reducirlo a 5 min respecto a los 60 min de la TPP convencional (Pakhale *et al.*, 2016).

4.3 Influencia del tiempo de aplicación de los USdP

Se ensayaron tiempos de aplicación inferiores a 5 min (2.5 y 1 min) con el objetivo de evaluar la influencia de esta variable en la extracción de la FeQ. Las cinéticas obtenidas a los diferentes tiempos se muestran en la figura 4.4.

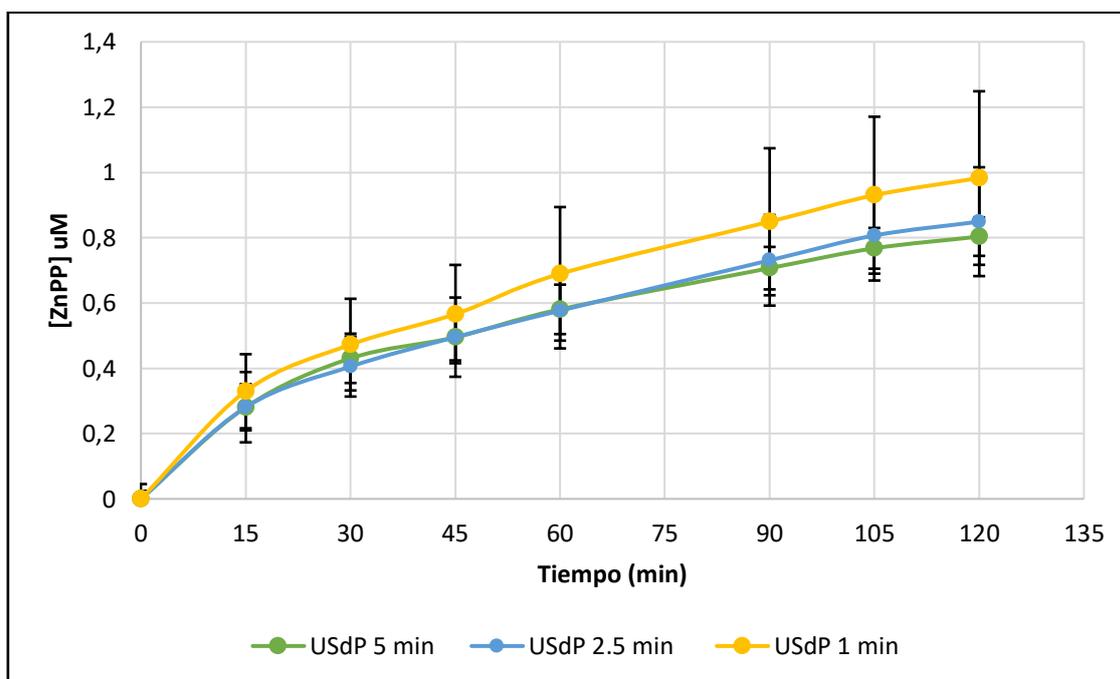


Figura 4.4: Cinéticas de reacción tras extracción asistida por USdP (5, 2.5 y 1 min), se muestran valores medios \pm desviación típica

Tal y como se observa en la figura 4.4, la aplicación de USdP durante menores tiempos ofreció cinéticas de reacción con la misma forma, pero con distintas pendientes y valores del producto máximo formado. La cinética obtenida tras la extracción asistida por ultrasonidos durante 1 min fue la que proporcionó un mayor producto formado (**0.9828 μM ZnPP**) y mayores velocidades de reacción. La extracción asistida por ultrasonidos durante 2.5 min generó una cinética muy similar a la de 5 min, pero con un producto máximo formado ligeramente mayor (**0.8491 μM ZnPP**). Los valores de velocidad de reacción calculados para las experiencias a 1 y 2.5 min, así como sus actividades enzimáticas específicas, aparecen mostrados en la tabla 4.3.

Tabla 4.3: Valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica para la cinética de extracción asistida por USdP (2.5 y 1 min)

	r_0 ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$)	r_p ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$)	AEE_0 ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{h \times \text{mg hígado}}$)	AEE_p ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{h \times \text{mg hígado}}$)
USdP 2.5 min	0.0187	0.0057	0.6273	0.1899
USdP 1 min	0.0220	0.0065	0.7366	0.2187

En la figura 4.5, se observa como los dos factores analizados estadísticamente (*tiempo de reacción* y *condición aplicada*) volvieron a tener un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la concentración de ZnPP. Al comparar entre los tiempos de aplicación de USdP, se observa que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre USdP 2.5 min y USdP 5 min. Sin embargo, sí que existió entre USdP 1 min y los otros dos tiempos ensayados.

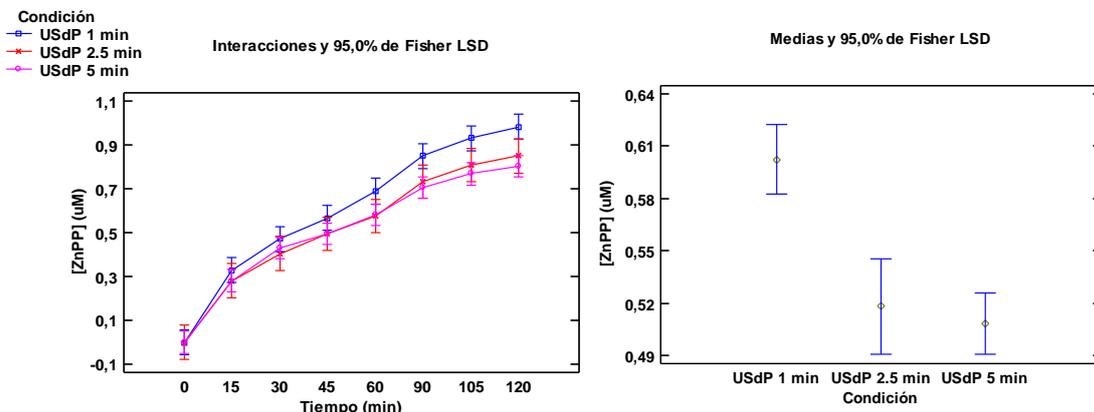


Figura 4.5: Análisis estadístico de la influencia del tiempo de aplicación de USdP (1 min, 2.5 min y 5 min); se muestran valores medios \pm intervalo de confianza LSD 95%

Si comparamos los resultados obtenidos respecto a la extracción convencional, la extracción asistida por USdP durante 1 min es la variante que ofrece mejores resultados, con un aumento del **29.2 %** sobre el producto máximo formado, una mejora del **30.0 %** sobre la velocidad de reacción obtenida a partir del tramo 1 y un **28.6 %** sobre la del tramo 2.

Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que mayor tiempo de aplicación de USdP no implica siempre mayor extracción del compuesto de interés. El éxito de la extracción depende de muchos factores y por eso cada proceso debe de ser optimizado hasta encontrar los parámetros ultrasónicos idóneos. Además, los resultados confirman el hecho de que toda la energía aplicada por los ultrasonidos no es siempre positiva para la extracción y es que también puede afectar negativamente a la naturaleza de la enzima. Por un lado, un mayor tiempo de exposición a los ultrasonidos implica un mayor efecto de la cavitación, el cual puede haber provocado daños mecánicos o degradaciones en la estructura proteica. Por otro lado, cuanto mayor es el tiempo de aplicación de ultrasonidos mayor es el calentamiento de la muestra, debido a la energía térmica producida por la intensa cavitación. En nuestro caso, a pesar de haber utilizado un eficiente sistema de refrigeración (ver Apartado 3.2.1.B), se han llegado a alcanzar temperaturas cercanas a los 40°C que pueden haber provocado la desnaturalización de parte del contenido enzimático del hígado donde se encuentra la FeQ.

Finalmente, se puede afirmar que la aplicación continuada de ultrasonidos durante 1 min ha resultado ser la opción más ventajosa y se puede establecer como el tiempo óptimo de entre todos los ensayados. La diferencia significativa ($p < 0.05$) obtenida respecto a los otros dos tiempos ensayados resalta la influencia que tiene la duración de los USdP sobre la extracción de la enzima y la necesidad de optimizar el proceso. Si consideramos constante la k_2 , podemos atribuir las diferencias al hecho de que con esta modalidad se consigue extraer la mayor cantidad de ferroquelatasa a partir del hígado porcino. Concretamente, aplicando USdP de manera continuada durante 1 min se consiguió extraer una concentración de enzima **1.40** veces superior a la extraída de manera convencional. Además, no debemos obviar el importante ahorro de tiempo que ofrece respecto a los 30 min de agitación magnética que supone hacer la extracción convencional, aspecto de vital importancia desde un punto de vista industrial.

4.4 Influencia de la frecuencia de aplicación de los USdP

El otro parámetro ultrasónico que fue modificado es la frecuencia de aplicación, pasando de una aplicación continuada a una aplicación pulsada. La frecuencia de aplicación se redujo a la mitad ajustando el controlador de pulsos a 0.5 (el sonicador aplica ultrasonidos durante medio segundo y después pausa durante otro medio segundo). En la figura 4.6 se muestran las cinéticas de reacción obtenidas tras asistir la extracción con USdP de manera pulsada durante 5, 2.5 y 1 min. Para poder comparar, se muestran también las cinéticas obtenidas tras la aplicación continua de USdP durante los mismos tiempos (Apartado 4.3).

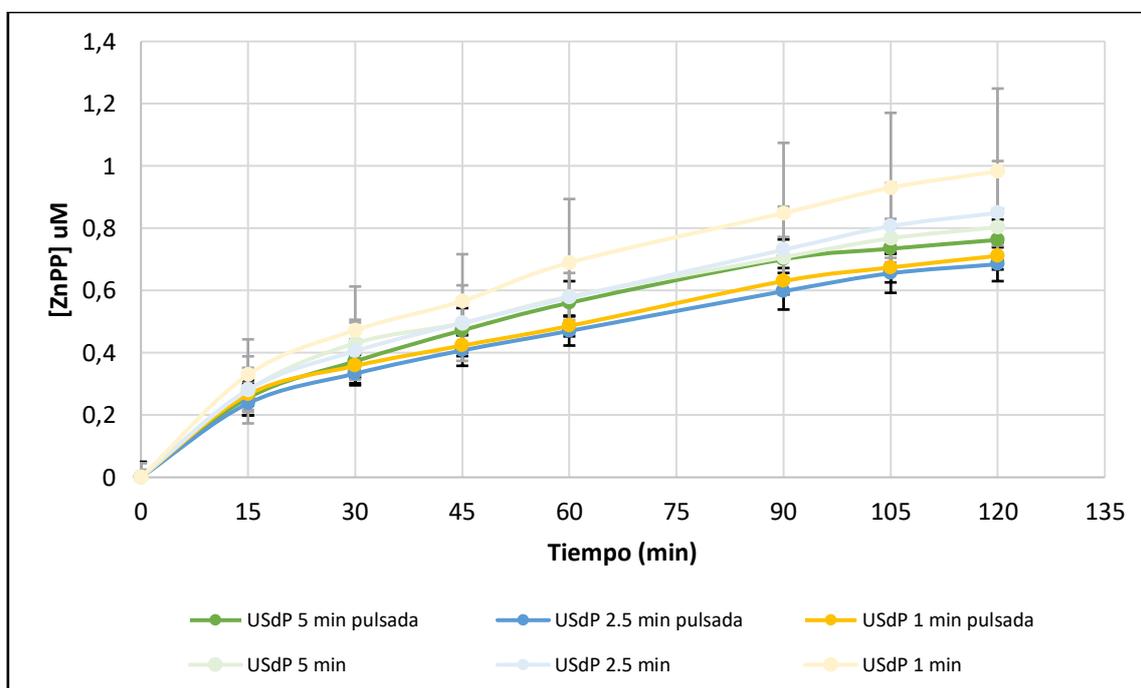


Figura 4.6: Cinéticas de reacción tras extracción asistida por USdP de manera pulsada (5, 2.5 y 1 min), se muestran valores medios \pm desviación típica

Se puede observar cómo reducir a la mitad la frecuencia de aplicación de USdP ofrece menores valores de producto máximo formado y velocidades de reacción inferiores. Esto se traduce en una menor extracción de la enzima ya que cuando reducimos a la mitad la frecuencia de aplicación de ultrasonidos estamos suministrando la mitad de energía a la muestra y por tanto el fenómeno de cavitación que acelera la transferencia de materia es de menor magnitud. Sin embargo, esto también implica un menor calentamiento de la muestra y por tanto, menos probabilidades de dañar la enzima. Por eso, ahora la temperatura deja de ser el factor limitante y el tiempo que ofrece una mayor mejora respecto a la extracción convencional no es 1 min, si no 5 min. Los valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica calculados para esta modalidad de extracción a los diferentes tiempos se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4: Valores de velocidad de reacción y actividad enzimática específica para la cinética de extracción asistida por USdP de manera pulsada (5, 2.5 y 1 min)

	r_0 ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$)	r_p ($\frac{\mu\text{mol de ZnPP}}{L \times \text{min}}$)	AEE_0 ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{h \times \text{mg hígado}}$)	AEE_p ($\frac{\text{nmol de ZnPP}}{h \times \text{mg hígado}}$)
USdP 5 min pulsada	0.0170	0.0053	0.5799	0.1801
USdP 2.5 min	0.0158	0.0045	0.5303	0.1519
USdP 1 min	0.0177	0.0048	0.5929	0.1592

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tiempos ensayados con USdP pulsados (Figura 4.7).

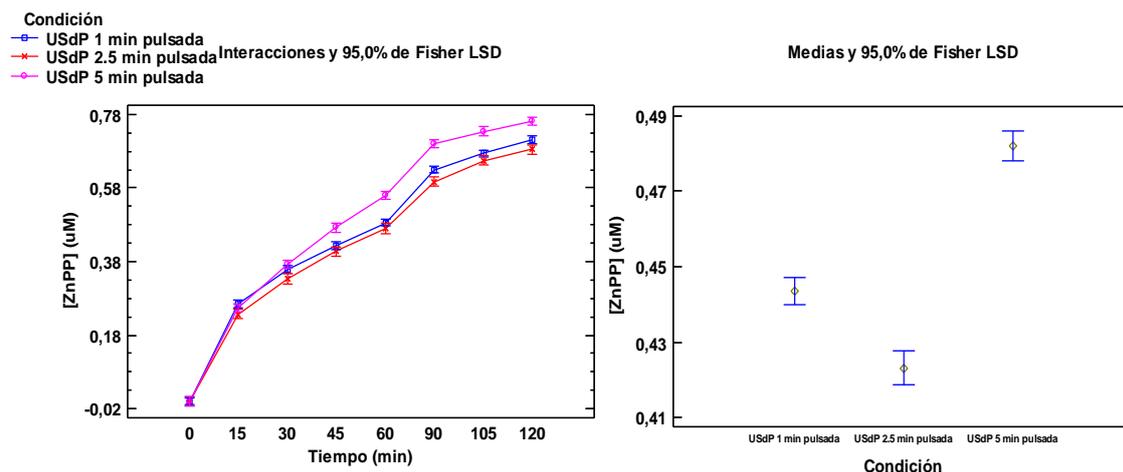


Figura 4.7: Análisis estadístico de la influencia del tiempo de aplicación de USdP pulsados (1 min, 2.5 min y 5 min); se muestran valores medios \pm intervalo de confianza LSD 95

Por otro lado, un segundo análisis sirvió para demostrar la diferencia significativa ($p < 0.05$) que existe entre aplicar los USdP de manera continua o de manera pulsada (Figura 4.8).

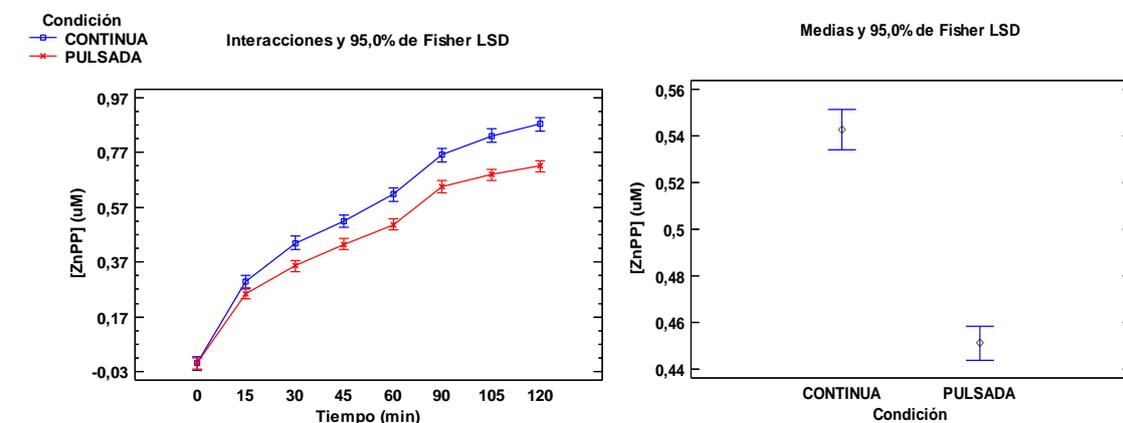


Figura 4.8: Análisis estadístico de la influencia de la frecuencia de aplicación de USdP (continua vs pulsada); se muestran valores medios \pm intervalo de confianza LSD 95%

De entre todos los tiempos ensayados mediante aplicación pulsada, el tiempo óptimo ha resultado ser 5 min con un producto máximo formado de **0.7624 µM ZnPP** lo que supone un aumento del **8.7 %** frente al valor obtenido mediante extracción convencional. La velocidad de reacción obtenida a partir del tramo 1 ha mejorado un **11.1 %**, mientras que la del tramo 2 ofrece una mejora del **13.3 %**. En cuanto a la concentración de enzima extraída, aplicar USdP durante 5 min de manera pulsada ha proporcionado un valor **1.15** veces superior a la concentración de enzima extraída de forma convencional. Las experiencias de USdP pulsados durante 1 y 2.5 min apenas logran una mejora respecto a la modalidad de extracción convencional. Con todo ello queda demostrado que cuando aplicamos USdP de manera pulsada conseguimos un mejor control de la temperatura y por eso el tiempo deja de ser tan influyente, pero a cambio el efecto que generamos sobre la extracción es mucho menor. En consecuencia, obtenemos menores incrementos en el producto máximo formado y en la velocidad de reacción, con valores lejos de los obtenidos cuando aplicamos USdP de manera continua.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se extraen de este trabajo son las que se exponen a continuación:

- La aplicación de los ultrasonidos de potencia (USdP) mediante un dispositivo tipo sonda ha demostrado ser un método eficaz para la extracción de la ferroquelatasa (FeQ) a partir del hígado de cerdo gracias a sus efectos mecánicos sobre las células hepáticas.
- Mediante la aplicación de los USdP, se han logrado mejoras significativas ($p < 0.05$) en la velocidad de reacción y en el producto máximo formado. Esto se traduce en una mayor concentración de enzima extraída respecto al método convencional de extracción.
- El tiempo de aplicación de los USdP resulta ser un factor determinante sobre el rendimiento de la extracción ya que tiempos elevados de exposición pueden dar lugar a una cavitación excesiva generando efectos negativos para la enzima.
- La frecuencia de aplicación de los USdP es también un factor a tener en cuenta ya que, aunque la aplicación pulsada permite un mejor control de la temperatura, ésta ofrece un menor rendimiento de extracción respecto a la aplicación continua.
- De entre todas las condiciones de extracción ensayadas, la modalidad que ha proporcionado extractos con mayor actividad enzimática ha resultado ser la aplicación de USdP durante 1 min de manera continua.
- Este trabajo pone de manifiesto la viabilidad y el potencial del uso de USdP para mejorar la extracción de la FeQ a partir del hígado de cerdo, no solo porque permite extraer una concentración superior de enzima si no también por el importante ahorro de tiempo que supone respecto a la extracción convencional.
- Además, ha contribuido a valorizar el hígado de cerdo como interesante co-producto de la industria cárnica y a profundizar en el conocimiento de la FeQ como enzima formadora del pigmento zinc-protoporfirina (ZnPP).
- A pesar de todo, el trabajo presentado supone una primera incursión en esta área y se necesitan estudios de mayor profundidad hasta lograr el método ideal para obtener una fracción enzimática capaz de ser utilizada en el desarrollo del color de productos cárnicos sin agentes nitrificantes añadidos.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

ADAMSEN, C. E., MOLLER, J. K. S., HISMANI, R., & SKIBSTED, L. H. (2004). Thermal and photochemical degradation of myoglobin pigments in relation to colour stability of sliced dry-cured Parma ham and sliced dry-cured ham produced with nitrite salt. *European Food Research and Technology*, 218(5): 403–409.

AMID, M., MURSHID, F.S., MANAP, M.Y. & ISLAM SARKER, Z. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of pectinase enzyme from guava (*Psidium guajava*) peel: Enzyme recovery, specific activity, temperature, and storage stability. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46: 91-99.

ANICE (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España) | El sector cárnico español. Retrieved May 17, 2019, from https://www.anice.es/industrias/el-sector/el-sector-carnico_171_1_ap.html

ARMSTRONG, F. B., & BENNETT, T. P. (1982). *Bioquímica*. Editorial Reverté. Barcelona. 550 pp.

ASENSIO, M. A. Y DÍAZ, M. C. (2001). *La estabilización del pernil desde la perspectiva microbiológica: un concepto ecológico dinámico*, en: Cap. VII de Tecnología del jamón ibérico, de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma. Editorial Mundi Prensa. Madrid. 512 pp.

AWAD, T. S., MOHARRAM, H. A., SHALTOUT, O. E., ASKER, D., & YOUSSEF, M. M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International*, 48: 410–427.

BANSODE, S.R. & RATHOD, V.K. (2017). An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38: 503-529.

BARTSCH, H., & MONTESANO, R. (1984). Relevance of nitrosamines to human cancer. *Carcinogenesis*, 5(11): 1381–1393.

BENEDINI, R., RAJA, V., & PAROLARI, G. (2008). Zinc-protoporphyrin IX promoting activity in pork muscle. *Food Science and Technology*, 41(7): 1160–1166.

BOE núm. 169, de 14/07/2018 | Real Decreto 1079/2008, de 27 de junio, por el que se regula el mercado de los jamones y paletas y los periodos de elaboración para la utilización de determinadas menciones en el etiquetado. Retrieved May 19, 2019, from https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2008-11987

BOE núm. 188, de 07/08/1998 | Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. Retrieved May 19, 2019, from <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1998-19112>

CAMADRO, J. M., & LABBE, P. (1982). Kinetic studies of ferrochelatase in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 707(2), 280–288.

CAMADRO, J. M., IBRAHAM, N. G., & LEVERE, R. D. (1984). Kinetic studies of human liver ferrochelatase. Role of endogenous metals. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(9): 5678–5682.

CHAU, T. T., ISHIGAKI, M., KATAOKA, T., & TAKETANI, S. (2010). Porcine Ferrochelatase: The Relationship between Iron-Removal Reaction and the Conversion of Heme to Zn-Protoporphyrin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(7): 1415–1420.

CHAU, T. T., ISHIGAKI, M., KATAOKA, T., & TAKETANI, S. (2011). Ferrochelatase Catalyzes the Formation of Zn-protoporphyrin of Dry-Cured Ham via the Conversion Reaction from Heme in Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22): 12238–12245.

CHEMAT, F., ROMBAUT, N., SICAIRE, A.G., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A.S. & ABERT-VIAN, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 34: 540-560.

CORDOBA, J. J., ANTEQUERA, T., GARCIA, C., VENTANAS, J., LOPEZ BOTE, C., & ASENSIO, M. A. (1994). Evolution of free amino acids and amines during ripening of Iberian cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(10): 2296–2301.

CROWELL, R., FERRIS, A. M., WOOD, R. J., JOYCE, P., & SLIVKA, H. (2006). Comparative Effectiveness of Zinc Protoporphyrin and Hemoglobin Concentrations in Identifying Iron Deficiency in a Group of Low-Income, Preschool-Aged Children: Practical Implications of Recent Illness. *Pediatrics*, 118(1): 224–232.

D.O. Jamón de Teruel | Denominación de Origen Protegida. Retrieved May 19, 2019, from <http://jamondeteruel.com/es/denominacion-de-origen/>

DE FERNICOLA, N. A. G. G. (1989). Metahemoglobinemia infantil causada por nitratos. *Bol of Sanit Panama*. 106 (1): 32-40.

DE MAERE, H., CHOLLET, S., CLAEYS, E., MICHIELS, C., GOVAERT, M., DE MEY, E., PAELINCK, H., FRAEYE, I. (2017). In Vitro Zinc Protoporphyrin IX Formation in Different Meat Sources Related to Potentially Important Intrinsic Parameters. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1): 131–142.

DELGADO-POVEDANO, M.M. & DE CASTRO, M.D.L. (2015). A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Analytica Chimica Acta*, 889: 1-21.

EUR – Lex | Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 19 de noviembre de 2008 sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. Retrieved May 17, 2019 from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008L0098-20180705&from=SK>

DJLBCARE / Eppendorf 5415D/5415R *Datasheet*. Retrieved May 19, 2019, from https://www.djblbcare.co.uk/djb/data/sheet/268029639/Eppendorf_5415R-Datasheet.pdf

DOLATOWSKI, Z. J., STADNIK, J., & STASIAK, D. (2007). Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, 6(3): 89-99. Retrieved from

EFSA (European Food Safety Authority) | EFSA confirms safe levels for nitrites and nitrates added to food (2017). Retrieved May 18, 2019, from <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/170615>

EFSA (European Food Safety Authority) | EFSA explains risk assessment of nitrites and nitrates added to food (2017). Retrieved May 18, 2019, from <https://doi.org/10.2805/485488>

ESSENTIA | APro™ - Blood-derived proteins for meat applications. Retrieved May 18, 2019, from <https://essentiaproteins.com/int/ingredients/meat/apro-series/>

FDA (Food and Drug Administration) | Generally Recognized as Safe (GRAS). Retrieved May 19, 2019, from <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>

FENG, H., BARBOSA-CANOVAS, G., & WEISS, J. (2011). *Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*. Springer, New York. 665 pp.

FERSHT, A. (1984). *Enzyme Structure and Mechanism (Second Edition)*. W H Freeman, New York. 146 pp.

GARCÍA-PÉREZ, J. V. (2007). *Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos*. Tesis doctoral en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 375 pp.

GE LIFE SCIENCE | Whatman 597 Filter Paper Circles 90 mm. Retrieved May 19, 2019, from <https://www.gelifesciences.com/en/at/shop/whatman-laboratory-filtration/speciality-cellulose-papers/seed-germination-testing-papers/grade-597-qualitative-filter-papers-p-00212#order>

GRAHAM, J. M. (2001). *Isolation of Mitochondria from Tissues and Cells by Differential Centrifugation*, in Vol. 4 of *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA.

GRUPO SELECTA | Centrífugas. Retrieved May 19, 2019, from <http://www.grupo-selecta.com/pdfs/es/cats/CENTR%C3%8DFUGAS.pdf>

HIELSCHER ULTRASONICS | UP400S ultrasonic processor (400 W, 24 kHz). Retrieved June 04, 2019, from http://www.bendarygroup.com/images/instruction_manual_up200_400s_2007_ultrasonics.pdf

IMLAB | Yellow line by IKA – DI 25 Basic. Retrieved June 04, 2019, from <http://www.imlab.com/yel/YL%20ENGL/YellowLine%20DI-18%20%20DI-25%20engl.pdf>

ISHIKAWA, H., YOSHIHARA, M., BABA, A., KAWABUCHI T., SATO, M., NUMATA, M., & MATSUMOTO, K. (2006). Formation of Zinc Protoporphyrin IX from Myoglobin in Porcine Heart Extract. *Food Science and Technology Research*, 12(2), 125–130.

KADAM, S. U., TIWARI, B. K., ÁLVAREZ, C., & O'DONNELL, C. P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1): 60–67.

KATO, T., & INOUE, N. (1981). Estimation of kinetic parameters, amount of endogenous substrate and contaminating enzyme activity in a target enzyme reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 661(1): 1–11.

LI, P., XIA, J., SHAN, Y., & NIE, Z. (2015). Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(10): 2013–2022.

LI, P.J., XIA, J.L., SHAN, Y. & NIE, Z.Y. (2015). Comparative study of multi-enzyme production from typical agro-industrial residues and ultrasound-assisted extraction of crude enzyme in fermentation with *Aspergillus japonicus* PJ01. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 38: 2013-2022.

LICAN | MyoRed Color Cárnico Natural. Retrieved May 18, 2019, from http://www.licanfood.com/pdf/myored_esp.pdf

LORÉS A., PÉREZ B. T., RONCALÉS R. P. (2012). Desarrollo del color y el flavor en jamones curados con y sin nitrificantes. Implicaciones en la seguridad alimentaria. *Eurocarne*. 206(5): 44-49.

MARCUS, D. L., IBRAHIM, N. G., & FREEDMAN, M. L. (1982). Age-related decline in the biosynthesis of mitochondrial inner membrane proteins. *Experimental Gerontology*, 17(5): 333-341.

MARTIN, C. J., WERNTZ, C. L., & DUCATMAN, A. M. (2004). The interpretation of zinc protoporphyrin changes in lead intoxication: a case report and review of the literature. *Occupational Medicine*, 54(8): 587-591.

MASON, T.J. (1998) *Power ultrasound in food processing - the way forward*, in Cap. VI of *Ultrasound in Food Processing*. Blackie Academic & Professional, London, 103-126 pp.

MEDINA-TORRES, N., AYORA-TALAVERA, T., ESPINOSA-ANDREWS, H., SÁNCHEZ-CONTRERAS, A., & PACHECO, N. (2017). Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7(3): 47.

MORITA, H., NIU, J., SAKATA, R., & NAGATA, Y. (1996). Red Pigment of Parma Ham and Bacterial Influence on its Formation. *Journal of Food Science*, 61(5): 1021-1023.

NADAR, S. S., PAWAR, R. G., & RATHOD, V. K. (2017). Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101: 931-957.

NADAR, S.S. & RATHOD, V.K. (2017). Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 33: 170.

NICO JAMONES | Las 4 fases del proceso de curación del jamón ibérico y serrano (2018). Retrieved May 18, 2019, from <https://www.nicojamones.com/las-4-fases-del-proceso-de-curacion-del-jamon-iberico-y-serrano/>

NUNEZ, M. T., COLE, E. S., & GLASS, J. (1983). The reticulocyte plasma membrane pathway of iron uptake as determined by the mechanism of alpha, alpha'-dipyridyl inhibition. *The Journal of Biological Chemistry*, 258(2): 1146-1151.

OCU (Organización de Consumidores y Usuarios) | ¿Ingrediente o aditivo? (2018). Retrieved May 17, 2019, from <https://www.ocu.org/alimentacion/alimentos/informe/ingrediente-o-aditivo/clean-label#>

OMS (Organización Mundial de la Salud) | Carcinogenicidad del consumo de carne roja y de la carne procesada. (2015). Retrieved May 17, 2019, from <https://www.who.int/features/qa/cancer-red-meat/es/>

OTLES, S., DESPOUDI, S., BUCATARIU, C. & KARTAL, C. (2015). *Food waste management, valorization, and sustainability in the food industry*, in: Cap. I of Food Waste Recovery. Charis M. Academic Press. San Diego, 3-23.

PAKHALE, S. V., & BHAGWAT, S. S. (2016). Purification of serratiopeptidase from *Serratia marcescens* NRRL B 23112 using ultrasound assisted three phase partitioning. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31: 532–538.

PARMA | Consorzio del Prosciutto di Parma. Retrieved May 18, 2019, from <https://www.prosciuttodiparma.com/>

PAROLARI, G., BENEDINI, R., & TOSCANI, T. (2009). Color Formation in Nitrite-Free Dried Hams as Related to Zn-Protoporphyrin IX and Zn-Chelatase Activity. *Journal of Food Science*, 74(6): 413–418.

PATIST, A., & BATES, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2): 147–154.

PÉREZ DUBÉ, D., & ROBLES, G. A. (2000). Cambios de coloración de los productos cárnicos. *Rev Cubana Aliment Nutr.* 14(2): 114-23.

PORTESA | Porcino de Teruel. Retrieved May 19, 2019, from <http://www.portesa.es/es>

RODRÍGUEZ, J. M. Z. (1997). Tecnología del jamon crudo-curado. *Ciencia y Tecnología Alimentaria (CYTA) Journal of Food*, 1(5): 134–138.

ROSSI, E., ATTWOOD, P. V., GARCIA-WEBB, P., & COSTIN, K. A. (1990). Inhibition of human lymphocyte ferrochelatase activity by hemin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1038(3), 375–381.

ROUHANI, H., SEPEHRI, N., MONTAZERI, H., KHOSHAYAND, M. R., GHAREMANI, M. H., OSTAD, S. N., DINARVAND, R. (2014). Zinc Protoporphyrin Polymeric Nanoparticles: Potent Heme Oxygenase Inhibitor for Cancer Therapy. *Pharmaceutical Research*, 31(8): 2124–2139.

SHUKLA, T.P. (1992). Microwave ultrasonics in food processing. *Cereal Foods World*, 37(4): 332.

SIGMA ALDRICH | Protoporphyrin IX disodium salt. Retrieved May 19, 2019, from https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/258385?lang=es®ion=ES&cm_sp=lnsite-_-prodRecCold_xviews-_-prodRecCold3-1

SONAC | QColor natural meat color: great looks, more sales. Retrieved May 18, 2019, from <https://www.sonac.biz/markets/food-ingredient-supplier/qcolor-natural-meat-color>

SORIA, A. C., & VILLAMIEL, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7): 323–331.

STUART EQUIPMENT | Stuart Scientific Magnetic Stirrer Hot Plate Stuart SM3 Model. Retrieved June 04, 2019, from <http://www.stuart-equipment.com/category.asp?dsl=103&mnu=49>

SZABO, O. E., CSISZAR, E., TOTH, K., SZAKACS, G., & KOCZKA, B. (2015). Ultrasound-assisted extraction and characterization of hydrolytic and oxidative enzymes produced by solid state fermentation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 249–256.

- SZABO, O.E., CSISZAR, E., TOTH, K., SZAKACS, G. & KOCZKA, B. (2015).** Ultrasoundassisted extraction and characterization of hydrolytic and oxidative enzymes produced by solid state fermentation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 249-256.
- TAKETANI S., & TOKUNAGA, R. (2005).** Purification and Substrate Specificity of Bovine Liver-Ferrochelatase. *European Journal of Biochemistry*, 127(3): 443–447.
- TECAN** | Instructions for Use for infinite® 200. (2008). Retrieved May 19, 2019, from www.tecan.com
- TOLDRÁ, F., ARISTOY, M.-C., & FLORES, M. (2000).** Contribution of muscle aminopeptidases to flavor development in dry-cured ham. *Food Research International*, 33(3–4): 181–185.
- TSIAKA, T., ZOUMPOULAKIS, P., SINANOGLU, V.J., MAKRIS, C., HEROPOULOS, G.A. & CALOKERINOS, A.C. (2015).** Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp. *Analytica Chimica Acta*, 877: 100-110.
- UNIPROT** | FECH - Ferrochelatase - *Sus scrofa* (Pig). Retrieved May 18, 2019, from <https://www.uniprot.org/uniprot/F1S1X4>
- URBAN-GRIMAL, D., & LABBE-BOIS, R. (1981).** Genetic and biochemical characterization of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* blocked in six different steps of heme biosynthesis. *MGG Molecular & General Genetics*, 183(1): 85–92.
- VENTANAS, J. (2012).** *Jamón Ibérico y serrano: fundamentos de la elaboración y de la calidad*. Editorial Mundi Prensa. Madrid. 187 pp.
- VENTANAS, S., MARTIN, D., ESTÉVEZ, M., & RUIZ CARRASCAL, J. (2004).** Nitratos, nitritos y nitrosaminas en productos cárnicos (I). *Eurocarne*, 14: 95–114.
- VERSCHOOR, M., HERBER, R., ZIELHUIS, R., & WIBOWO, A. (1987).** Zinc protoporphyrin as an indicator of lead exposure: precision of zinc protoporphyrin measurements. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 59(6): 613–621.
- VILKHU, K., MAWSON, R., SIMONS, L., & BATES, D. (2008).** Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2): 161–169.
- WAKAMATSU, J., HAYASHI, N., NISHIMURA, T., & HATTORI, A. (2010).** Nitric oxide inhibits the formation of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX. *Meat Science*, 84(1): 125–128.
- WAKAMATSU, J., MURAKAMI, N., & NISHIMURA, T. (2015).** A comparative study of zinc protoporphyrin IX-forming properties of animal by-products as sources for improving the color of meat products. *Animal Science Journal*, 86(5): 547–552.
- WAKAMATSU, J., NISHIMURA, T., & HATTORI, A. (2004).** A Zn–porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham. *Meat Science*, 67(1): 95–100.
- WAKAMATSU, J., OKUI, J., HAYASHI, N., NISHIMURA, T., & HATTORI, A. (2007).** Zn protoporphyrin IX is formed not from heme but from protoporphyrin IX. *Meat Science*, 77(4): 580–586.

WAKAMATSU, J., OKUI, J., IKEDA, Y., NISHIMURA, T., & HATTORI, A. (2004). Establishment of a model experiment system to elucidate the mechanism by which Zn–protoporphyrin IX is formed in nitrite-free dry-cured ham. *Meat Science*, 68(2): 313–317.

ZHANG, Q.A., ZHANG, Z.Q., YUE, X.F., FAN, X.H., LI, T. & CHEN, S.F. (2009). Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder. *Food Chemistry* 116: 513-518.

ZHU, Z.Z., HE, J.R., LIU, G., BARBA, F.J., KOUBAA, M., DING, L.H., BALS, O., GRIMI, N. & VOROBIEV, E. (2016). Recent insights for the green recovery of inulin from plant food materials using non-conventional extraction technologies: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33: 1-9.