

## Efecto del fraccionamiento con membranas sobre la actividad biológica de hidrolizados enzimáticos de proteína de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*)

Yhoan S. Gaviria y José E. Zapata\*

Grupo de investigación en nutrición y tecnología de alimentos, NUTEC, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.  
(correo-e: yhoan.gaviria@udea.edu.co; edgar.zapata@udea.edu.co)

\* Autor a quien debe ser dirigida la correspondencia.

Recibido Oct. 24, 2022; Aceptado Dic. 10, 2022; Versión final Dic. 23, 2022, Publicado Abr. 2023

### Resumen

El principal objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la separación con membranas sobre la actividad biológica de hidrolizados enzimáticos de proteínas de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). Para la hidrólisis enzimática se usa un reactor de vidrio 0.5 L. El fraccionamiento se realiza en un sistema de ultrafiltración tangencial con membranas de 1kDa y 3kDa. Al hidrolizado y sus fracciones se les determinan sus capacidades antioxidantes y la capacidad de quelación de hierro. Los resultados muestran que el componente mayoritario de la pasta es proteína, siendo las albuminas el 65%. Por otra parte, la mayor reducción de flux de permeado se da en la membrana de 1kDa (19 L/m<sup>2</sup>h), presentando bloqueo completo de poros como mecanismo de ensuciamiento. En conclusión, la fracción <3kDa presenta la mayor capacidad antioxidante y quelante de hierro, mientras que la filtración en membranas <1kDa presenta la mayor reducción de flux de permeado.

*Palabras clave:* hidrolisis; membranas; ultrafiltración; actividad biológica; lombriz roja californiana; *Eisenia foetida*

## Effect of membrane fractionation on the biological activity of enzymatic protein hydrolysates from red Californian earthworm (*Eisenia foetida*)

### Abstract

The primary objective of the present study is to evaluate the effect of membrane separation on the biological activity of enzymatic hydrolysates and protein fractions from the red Californian earthworm (*Eisenia foetida*). Enzymatic hydrolysis is performed using a 0.5 L glass reactor. Fractioning is attained by using a tangential ultrafiltration system with 1kDa and 3kDa membranes. Antioxidant and iron chelating capacity are assessed for the hydrolysate and its fractions. The results show that the major component of the paste is protein, mainly albumins (65%). The highest reduction of permeate flux occurs in the 1kDa membrane (19 L/m<sup>2</sup>h). In conclusion, the <3kDa fraction has the highest antioxidant and iron chelating capacity, while filtration in <1kDa membranes yields the highest permeate flux reduction.

*Keywords:* hydrolysis; membrane; ultrafiltration; biological activity; red Californian earthworm; *Eisenia foetida*

## INTRODUCCIÓN

El desarrollo agroindustrial se centra fundamentalmente en el incremento de la disponibilidad de alimentos y de la calidad de vida de la población, sin embargo, así mismo, se genera un aumento significativo en el volumen de residuos, que pueden llegar a tener un efecto relevante en el ambiental (Heller y Keoleian, 2015). El aprovechamiento de estos residuos representa un reto para la agroindustria, ya que no solo se pretende mitigar el impacto ambiental, sino también darles valor agregado a estos subproductos para generar iniciativas rentables para el sector agrícola. En este contexto la lombricultura surge como una opción de gran viabilidad, ya que es un proceso biológico en el que los subproductos vegetales y residuos agrícolas, se transforman en productos de alto valor en la agricultura como es el caso del humus líquido y sólido. Esta actividad ha presentado un crecimiento acelerado en los últimos años debido a su facilidad de cuidado de la lombriz, rápida reproducción y crecimiento (Rodrigues et al., 2017). Diferentes especies de lombriz de tierra se han empleado desde mucho tiempo atrás principalmente para la obtención de abono orgánico, pero pueden también considerarse una excelente fuente de proteína de compuestos biológicos y farmacológicos activos, que han sido empleados en el tratamiento de diversas enfermedades, principalmente por las culturas China e hindú (Sun, 2015). En las últimas décadas, se ha demostrado que las lombrices tienen un alto contenido nutricional (Paoletti et al., 2003) y propiedades antipiréticas, antiespasmódicas, destoxicantes, diuréticas, antihipertensivas, antialérgicas, antiasmáticas, antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatorias y contra las úlceras (Balamurugan et al., 2008).

La hidrólisis de proteínas consiste en la ruptura de los enlaces peptídicos y catálisis enzimática o química (Benítez et al., 2008). Debido a la ruptura del enlace las propiedades moleculares de las proteínas y los péptidos cambian, generando así un aumento de la carga y la liberación de los grupos hidrofóbicos (Li-Chan, 2015), que conlleva a mejorar el valor nutricional y las propiedades tecno-funcionales de las mismas. La hidrólisis enzimática es la metodología más común y ampliamente utilizada para obtener péptidos bioactivos ya que usa condiciones de operación moderadas, con cierto grado de especificidad por sustrato (Suarez et al., 2021). Por otro lado, se han investigado diferentes especies de lombriz de tierra como *Eisenia Andrei* (Rodrigues et al., 2017), *Lumbricus rubellus* (Azmi et al., 2014) entre otras, para la obtención de péptidos mediante procesos de hidrólisis enzimática con diferentes propiedades biológicas como capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana, entre otras. Sin embargo, se presentan pocos informes en la literatura sobre hidrolizados enzimáticos de lombriz roja californiana (*Eisenia fétida*) o de su líquido celomático y sus posibles propiedades biológicas (Qin et al., 2010).

El fraccionamiento de los hidrolizados en diferentes rangos de pesos moleculares se lleva a cabo como primera etapa de purificación de péptidos, ya que se ha demostrado que el peso molecular influye directamente en las propiedades bioactivas de los péptidos (Pezeshk et al., 2019). Mediante la ultrafiltración a través de membranas de diferentes tamaños de poros se pueden concentrar fracciones bioactivas de los hidrolizados obtenidos (Daroit y Brandelli, 2021). La filtración tangencial a flujo cruzado (TFF) es definido como un proceso físico en el cual un flujo de alimentación circula en paralelo a la superficie de una membrana mediante un diferencial de presión, en donde se obtiene una separación de los sólidos insolubles, coloides, emulsiones, moléculas e iones presentes en el fluido. Este mecanismo de separación utiliza una membrana para aislar partículas de un determinado tamaño, en donde las partículas más pequeñas que el tamaño del poro fluyen a través de un filtrado y las más grandes quedan retenidas, estos sistemas incluyen micro, ultra y nanofiltración (Schäfer y Fane, 2021). Es por esto, que en el presente trabajo se planteó como objetivo, evaluar el efecto de la separación con membranas sobre la actividad antioxidante y quelante de hierro de hidrolizados enzimáticos de proteína de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la obtención de pasta de lombriz, los animales fueron separados manualmente del sustrato de alimentación, posteriormente lavados con agua potable para eliminar los residuos de sustrato. A continuación, las lombrices fueron purgadas durante 4 horas con una solución de bicarbonato de sodio al 4%, posteriormente se realizó un lavado con agua potable para eliminar los residuos de solución de bicarbonato. El beneficio se realizó mediante solución salina 7% durante un periodo de 30 min, finalmente la pasta es lavada con agua potable y congelada para los ensayos posteriores.

### Caracterización bromatológica

La caracterización proximal de la pasta de lombriz fue realizada de acuerdo con lo establecido por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists). El contenido de humedad se determinó siguiendo la metodología establecida en la norma AOAC 930.1, secando la muestra a 105° C durante 8 horas. La proteína se cuantificó por el método Kjeldahl, AOAC 954.010. El contenido de cenizas totales se analizó de acuerdo con la norma AOAC 942.05. Por otra parte, el contenido de extracto etéreo se realizó según la norma AOAC 920.39.

## Hidrolisis enzimática

El proceso de hidrólisis enzimática se llevó a cabo en un reactor de vidrio 0,5 L el cual es cargado completamente con la pasta de lombriz roja californiana en una concentración de 30g/L de proteína. Para el control de pH y temperatura se implementó con un electrodo combinado de vidrio, conectado a un titulador automático TitroLine 6000 (SI Analytics GmbH, Alemania). La reacción fue monitoreada en el tiempo durante 4000 segundos por medio del grado de hidrólisis (GH), el cual se define como la relación entre el número de enlaces peptídicos hidrolizados (h) y el número de enlaces peptídicos totales en la proteína nativa por unidad de peso (ht: 8,1 mequiv/g) el cual es calculado sumando las moles totales de los aminoácidos contenidos en sustrato (Adler-Nissen, 1985). El método empleado para la determinación del GH fue el de valoración del protón o método del pH-estático. Este consiste en mantener constante el valor de pH en el medio de reacción con adición de una solución básica (NaOH 1 N), puesto que a medida que avanza la hidrólisis en medio alcalino, el grupo carboxilo terminal se disocia por completo y los protones formados se reparten de acuerdo con el equilibrio de protonación de los grupos  $\alpha$ -amino liberados. Para calcular el GH se implementó la ecuación 1 (Adler-Nissen, 1985).

$$GH (\%) = \frac{B * N_B}{M_P * \alpha * h_t} * 100 \quad (1)$$

B corresponde al volumen de hidróxido de sodio consumido en L, MP es la masa de proteína cargada en el reactor en kg, NB la normalidad del hidróxido de sodio, y  $\alpha$  el grado de disociación de los grupos aminos liberados en la hidrólisis. El valor de  $\alpha$  es calculado en función de la temperatura y el pK de la reacción, de acuerdo con las ecuaciones 2 y 3 respectivamente (Gómez y Zapata, 2017).

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{(1 + 10^{pH-pK})} \quad (2)$$

$$pK = 7,8 + \frac{(298 - T)}{298 * T} * 2400 \quad (3)$$

## Fraccionamiento de péptidos mediante sistema de UFT

El fraccionamiento del hidrolizado se realizó mediante un sistema de ultrafiltración tangencial como el que se presenta en la figura 1, el sistema consta de un tanque de alimentación de 10 litros de capacidad, una bomba de paletas rotativas de desplazamiento positivo procon (Standex Electronics, Inc., USA) en acero inoxidable serie-3 de 140gph conexión 3/8"hnpt grado alimentos, dos manómetros de presión a la entrada y a la salida de la membrana y un caudalímetro para el flujo de retenido (Georg Fischer Signet LLC, USA).

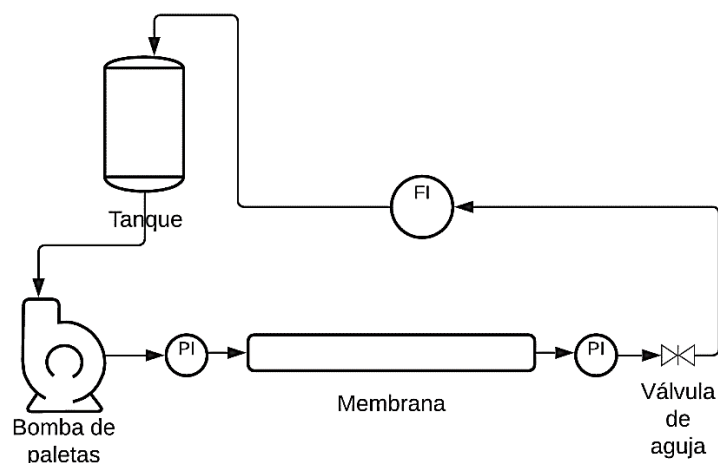


Fig. 1: Sistema de ultrafiltración tangencial

Para esto se usó membranas de 7 canales de 0,013 m<sup>2</sup> de área superficial de filtrado y 250 mm de longitud (Tami Inc., Francia) formada por una capa filtrante de ZrO<sub>2</sub> sobre un soporte de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> con pesos moleculares de corte de 3 y 1 kDa, utilizando una presión transmembrana (PTM) de 4 bar y un caudal de retención de 450 L/h a 20°C y pH 8,5. Para la limpieza de la membrana se hizo recircular una solución de hidróxido de sodio a 20g/L a 80°C durante un tiempo total de 1 hora; inicialmente con la válvula completamente abierta (PTM=0) durante 15 min y posteriormente usando una PTM de 4,5 bares durante los 45 min restantes (Blanpain-Avet

et al., 2004; Shi et al., 2014; Wang et al., 2014). Posteriormente se realizaron enjuagues a la membrana usando agua desionizada para eliminar los residuos de hidróxido de sodio en el sistema de ultrafiltración, eso se realizó hasta obtener pH neutro (Ahmed y Wang, 2019).

Por otra parte, la medición de la resistencia por ensuciamiento se llevó a cabo aplicando la ley de Darcy (ecuación 4), donde  $J$  es el flujo de salida del permeado,  $\Delta P$  es la diferencia de presión aplicada en los dos lados de la membrana,  $\mu$  es la viscosidad, y  $\Sigma R$  es la suma de las resistencias contra la permeación del fluido (Ali et al., 2010; Seyed y Reyhani, 2014).

$$J = \frac{\Delta P}{\mu \Sigma R} \quad (4)$$

La  $\Sigma R$  puede considerarse como la suma de la resistencia intrínseca de la membrana ( $R_m$ ) y la resistencia derivada de la capa de polarización de gel y la formación de la torta se denomina  $R_f$ , que a su vez es considerada como la resistencia de Fouling. La  $R_m$  puede calcularse mediante la ecuación 5, para lo cual debe medirse el flujo de agua destilada a través de la membrana virgen (nueva). En esta condición, no hay bloqueo en la membrana ( $R_f = 0$ ) siendo  $J_{wi}$  es el flujo de permeado de agua destilada.

$$J_{wi} = \frac{\Delta P}{\mu R_m} \quad (5)$$

A medida que avanza el proceso de filtración y el bloqueo de la membrana, la resistencia derivada del bloqueo y la formación de la torta también se debe incluir en el cálculo. Por lo tanto, la ecuación 1 debe escribirse de acuerdo con la ecuación 6, donde  $J_{ww}$  corresponde al flujo de permeado con el fluido de trabajo en un tiempo determinado de filtración.

$$J_{ww} = \frac{\Delta P}{\mu R_f} \quad (6)$$

### Mecanismos de ensuciamiento

Para identificar el mecanismo de ensuciamiento que se produce durante la UF del hidrolizado de lombriz roja californiana, se usó el modelo matemático establecido por la ley de Hermia (Tomczak y Gryta, 2021). La mencionada ley de filtración de bloqueo se expresa en términos de volumen de permeación  $V$  y tiempo de filtración  $t$ , de la siguiente manera:

$$\frac{d^2 t}{dV^2} = k \left( \frac{dt}{dV} \right)^n \quad (7)$$

donde  $k$  es constante y  $n$  es un valor que ilustra los diferentes mecanismos de ensuciamiento.

Bloqueo completo ( $n=2$ )

$$\ln(J) = \ln(J_0) - K_c t \quad (8)$$

Bloqueo estándar ( $n=1.5$ )

$$\frac{1}{J^{1/2}} = \frac{1}{J_0^{1/2}} + K_s t \quad (9)$$

Bloqueo intermedio ( $n=1$ )

$$\frac{1}{J} = \frac{1}{J_0} + K_i t \quad (10)$$

Formación de torta ( $n=0$ )

$$\frac{1}{J^2} = \frac{1}{J_0^2} + K_g t \quad (11)$$

Para determinar los mecanismos de ensuciamiento se comparó los valores de los coeficientes de correlación  $R^2$  obtenidos del análisis de regresión lineal utilizando las ecuaciones 8-11, asumiendo que la ecuación con mayor  $R^2$  corresponde al mecanismo dominante de ensuciamiento de la membrana (Tomczak y Gryta, 2021).

### Actividad antioxidante y quelante

Las actividades biológicas del hidrolizado y las fracciones de lombriz roja californiana se dividen en 4 TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), Medición de FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power), Medición de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) y Medición de la capacidad quelante de hierro (CQH).

#### Medición de TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity)

Se realizó siguiendo el método descrito por Re et al., (1999), en el cual 20 µL de la muestra o estándar Trolox, son mezclados con 180 µL de la solución ABTS\* (mezcla partes iguales de solución ABTS 7mM y persulfato de potasio 2.45mM) e incubados a 30 °C por 30 min. Después de esto se toman las medidas de absorbancia a 730 nm, en un equipo lector de multiplicas Varioskam Lux (Thermo Fisher Scientific, USA). Como estándar para la curva de calibración se usó trolox en concentraciones entre 0 – 500 µM. Los resultados son expresados como micro moles de equivalentes Trolox por gramo de proteína hidrolizada(µmolET/g).

#### Medición de FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Se llevó a cabo con la metodología descrita por Benzie y Straint, (1996), donde 175 µL del reactivo FRAP (TPTZ, FeCl y buffer de acetato de sodio) se mezclan con 25 µL de la muestra o estándar Trolox y se incuban a 37 °C por 30 min. Después de este tiempo se lee la absorbancia a 595 nm en un equipo lector de multiplicas Varioskam Lux (Thermo Fisher Scientific, USA). Como estándar para la curva de calibración se usó trolox en concentraciones entre 0 – 500 µM. Los resultados son expresados como micro moles de equivalentes Trolox por gramo de proteína hidrolizada(µmolET/g).

#### Medición de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

El ensayo ORAC se realizó según el método de Ou et al., (2001). Todas las soluciones de trabajo de AAPH (2,2'-Azobis-(2-amidinopropane), 2HCl, 2,2'-Azobis-(2-methylpropionamidine)), fluoresceína e hidrolizado de lombriz se diluyeron en buffer fosfato 75mM (pH 7,4) y la mezcla de reacción final fue de 200 mL. Las soluciones de hidrolizado (50 µL) y fluoresceína (50 µL; 78 nmol/L de concentración final) se pusieron en la microplaca negra de 96 pozos. La mezcla se pre incubó durante 15 min a 37°C antes de añadir el AAPH (25 µL; 40 mmol/L de concentración final). La fluorescencia fue registrada cada minuto durante 120 min. Las medidas de fluorescencia se realizaron a 37°C. Los filtros de excitación y emisión fueron de 485 y 520 nm, respectivamente usando un equipo lector de multiplicas Varioskam Lux (Thermo Fisher Scientific, USA).

#### Medición de la capacidad quelante de hierro (CQH)

La capacidad de las fracciones de péptidos de lombriz para quelar Fe<sup>2+</sup> se midió por el método de (Decker y Welch, 1990). Se añadió un volumen de 7,5 µL de una solución de cloruro ferroso 2 mM (FeCl<sub>2</sub>, Sigma Aldrich) a 277,5 µL de soluciones de péptidos Después de 3 min de incubación a temperatura ambiente (25 °C), se inhibió la reacción mediante la adición de 15 µL de una solución de ferrozina 5- mM (Sigma Aldrich). Tras 10 min, se midió la absorbancia a 560 nm. Se utilizó el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma Aldrich) como molécula de referencia (solución de 0 a 100 mM). Una disminución de la absorbancia corresponde a un aumento de la capacidad de quelación del hierro. La capacidad de una muestra para quelar el ion ferroso Fe<sup>2+</sup> se calculó como:

$$CQH = \frac{A_0 - A_s}{A_0} \quad (12)$$

En esta ecuación, A<sub>0</sub>: absorbancia del control y AS: absorbancia de la muestra.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se observa la composición proximal de la pasta de lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*). La pasta presenta un alto contenido de proteína en comparación con sus demás macro compuesto, siendo esta principalmente albuminas, globulinas y glutelinas con un 65,25%, 20,12% y 11,87% respectivamente.

Tabla 1: Composición bromatológica pasta de lombriz roja californiana \*Base seca

Componente	Lombriz roja Californiana *
Humedad (%)	84.87 ± 0.06
Proteína (%) *	67.06 ± 0.08
Grasa (%)	1.42 ± 0.38
Cenizas (%)	5.82 ± 0.39
Albuminas (%)	65.25 ± 0.28
Globulinas (%)	20.12 ± 0.12
Prolaminas (%)	2.85 ± 0.07
Glutelinas (%)	11.87 ± 0.09

Este valor de proteína se encuentra en el rango normal de acuerdo con lo reportado en la literatura, en la que se menciona que la lombriz de tierra presenta valores de proteína superiores al 60% (Muller et al., 2017; Rodrigues et al., 2017). Adicionalmente se resalta el alto contenido de minerales con un 5,82% en la composición nutricional.

### Comportamiento del sistema de membranas

El comportamiento de un sistema de filtración tangencial a flujo cruzado depende de múltiples factores entre los que se cuentan la naturaleza y concentración de los solutos y disolventes, los materiales de la membrana y las características de la superficie, el tamaño de los poros y su distribución, así como la hidrodinámica del sistema (Shi et al., 2014). Siendo la porosidad uno de los aspectos más relevantes desde el punto de vista de la membrana en sí, existen otros factores con fuerte impacto sobre su, particularmente en lo referente al ensuciamiento y el desarrollo de resistencia al flujo. entre los que se cuenta la relación de rechazo, la hidrofobicidad, la estabilidad térmica, y sus propiedades mecánicas (Crittenden, C., Rhodes, R., y Hand, W., 2017). En la figura 2 se observa el comportamiento del flux de permeado en las membranas de 3 y 1 kDa en función del tiempo (120 min), por otra parte, el coeficiente de determinación de los modelos de Hermia se presentan en la tabla 2, encontrando que ninguno de los modelos ajustados a los datos experimentales puede predecir con exactitud el mecanismo de disminución del flujo de permeado durante la UF de hidrolizado de lombriz roja californiana en membranas de 3 y 1 kDa. La membrana de 1kDa presenta un mayor flux de permeado en los primeros momentos de la filtración, sin embargo, después de los 30 min, se observa un marcado descenso, llegando a perder más del 62 % del flux inicial cuando llega a los 120 min de filtración. Mientras que, la membrana 3kDa inicia con valores menores, pero durante los 120 min del proceso solo pierde cerca del 10 % de su flux inicial, por lo que termina por encima de la de 3kDa. Este comportamiento señala que la resistencia a la filtración en la membrana de 1kDa inicia menor, pero a través del proceso se hace mayor que la de 3kDa. Posiblemente el tamaño de los péptidos en el hidrolizado, hacen que en los primeros minutos de filtración no puedan ingresar en los poros de la membrana más pequeña (1kDa), pero si lo hagan en la más grande (3kDa), por lo que la membrana sin material en los poros (menor resistencia), presentará mayor flux de permeado.

Sin embargo, se debe tener presente que el flux de permeado en una membrana, bajo una fuerza motriz constante (PTM) se ve afectada por un fenómeno denominado polarización por concentración, que es una consecuencia natural de la semipermeabilidad y la selectividad de una membrana, y da lugar a una acumulación de solutos o partículas rechazadas en una capa límite de transferencia de masa adyacente a la superficie de la membrana (Shi et al., 2014). Dicho fenómeno se da particularmente durante la filtración de solutos de bajo peso molecular o macromoléculas, cuando estos solutos son arrastrados hacia la superficie de la membrana por el flujo de permeación, las moléculas de disolvente pasan la membrana, pero los solutos más grandes son rechazados y retenidos en su superficie. Estas moléculas rechazadas difunden con relativa lentitud de vuelta a la solución principal, lo que provoca un gradiente de concentración justo por encima de la superficie de la membrana, siendo este gradiente mayor a porosidades menores (Shi et al., 2014). Este material que se acumula en la membrana impide el flux de permeado a través de esta, y crea una contrapresión osmótica que reduce la TMP efectiva del sistema. La polarización por concentración es inevitable, pero es un fenómeno reversible que no afecta por sí mismo a las propiedades intrínsecas de la membrana (Shi et al., 2014).

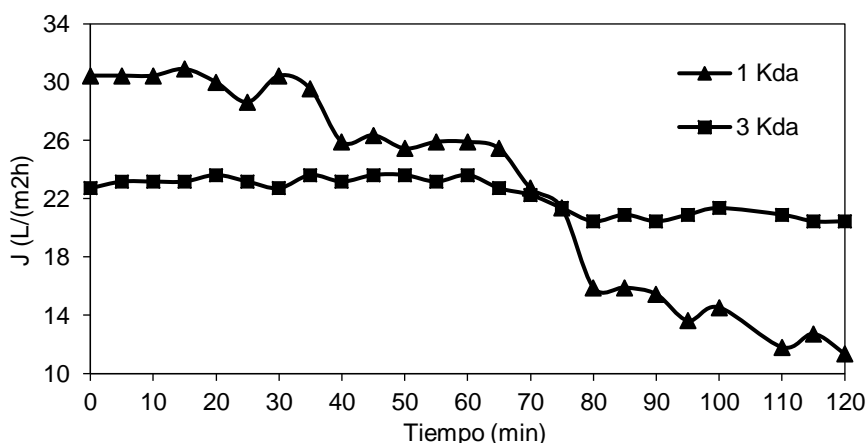


Fig. 2: Comportamiento del flux de permeado en función del tiempo y del tamaño de poro en la filtración tangencial de hidrolizados

Tabla 2: Coeficiente de determinación ( $R^2$ ) modelos de Hermia (\*Indica el mejor ajuste)

Mecanismo	3 kDa	1 kDa
Bloqueo completo	0.6789	0.8884*
Bloqueo estándar	0.6804	0.8678
Bloqueo intermedio	0.6819	0.8440
Formación de torta	0.6843*	0.7883

La reducción del flujo de permeado se produce, además, debido al fenómeno denominado ensuciamiento, que tiene lugar cuando la materia de la solución de alimentación abandona la fase líquida para formar un depósito en la superficie de la membrana o en el interior de su estructura porosa incrementando la resistencia para que el permeado salga (Shi et al., 2014). En la tabla 3 se presentan los valores de las diferentes resistencias obtenidas después de filtrar hidrolizados de proteínas de lombriz roja californiana, durante dos horas, y las resistencias intrínsecas en de membranas de 1 y 3 kDa. Se debe notar como la resistencia intrínseca o resistencia propia de la membrana es mayor para la membrana de 1 kDa que para la de 3kDa, lo que se debe fundamentalmente a que el menor tamaño de poro genera mayor oposición al flux de permeado (Crittenden, et al., 2017).

Tabla 3: Resistencias membranas de ultrafiltración

Resistencia	Símbolo	3 kDa	1 kDa
Intrínseca	Rm	2.85 + 0.09	3.39 ± 0.04
Total	Rt	13.81 ± 0.85	15.38 ± 0.13
Irreversible	Rif	3.89 ± 0.05	4.96 ± 0.58
Reversible	Ref	5.81 ± 0.09	6.35± 0.19
Fouling	Rf	10.96 ± 0.18	11.99± 0.48

El ensuciamiento suele producirse a través de mecanismos como la adsorción, el bloqueo de poros y la formación de torta. Este fenómeno provoca una acumulación de material en la superficie, es decir, ensuciamiento externo y/o en la estructura de los poros, es decir, ensuciamiento interno (bloqueo estándar) de una membrana. Muchas investigaciones distinguen las incrustaciones reversibles e irreversibles en función de su resistencia relativa a la limpieza (Shi et al., 2014). Las incrustaciones reversibles son las que pueden eliminarse fácilmente métodos de limpieza físicos, como enjuagues con agua a alta velocidad por el canal de retenido, mientras que las irreversibles permanecen después de dicha limpieza. El ensuciamiento irreversible puede darse por medio de adsorción, que se produce cuando existen interacciones específicas entre los solutos/partículas y la membrana. Es una consecuencia de la energía superficial y un proceso de equilibrio termodinámico. Las interacciones suelen ser del tipo, fuerzas de Van der Waals, atracciones electrostáticas o enlaces químicos, según los grupos funcionales implicados (Shi et al., 2014). Se produce de forma espontánea y casi instantánea.

Este es un problema común cuando se separan macromoléculas como las proteínas y los ácidos húmicos (HA), adicionalmente el material adsorbido en la membrana puede alterar sus características superficiales, como la hidrofobicidad o la carga (Schäfer y Fane, 2021). Otro mecanismo que podría generar la resistencia irreversible es el bloqueo de los poros, el cual se produce debido al cierre total (bloqueo completo) o parcial (bloqueo intermedio) de los poros de la membrana por coloides y partículas (Schäfer y Fane, 2021). Suele ocurrir rápidamente en las etapas iniciales de la filtración, cuando la superficie de la membrana está libre de depósitos y las partículas entrantes pueden estar en interacción directa con un poro de la membrana (Shi et al., 2014). Se observa que la resistencia irreversible en la membrana de 1kDa es mayor en comparación con la membrana de 3kDa esto puede deberse al mecanismo de ensuciamiento por bloqueo completo de poros el cual presento el mejor ajusto para dicha membrana (tabla 2), en este mecanismo el poro se satura completamente de material filtrante e impide el paso de partículas reduciendo completamente el flujo por el poro bloqueado y aumentando la resistencia de la membrana (Tomczak y Gryta, 2021).

Con respecto a la resistencia reversible se observa nuevamente que la membrana de 1kDa presenta un mayor valor en comparación con la membrana de 3kDa, esto se puede deberse a los demás mecanismos involucrado en el proceso de ultrafiltración que no se encuentran aislados unos de otros; por su parte la membrana de 3 kDa presenta un valor elevado en su resistencia reversible esto se debe fundamentalmente al mecanismo de formación de torta la cual es el proceso donde las partículas se acumulan capa a capa en la superficie externa de una membrana, lo que provoca una resistencia adicional al flujo de permeado, siendo este el mecanismo que mejor se ajusta a la membrana de 3kDa (tabla 2), esto se suele denominar formación de una torta de ensuciamiento y la resistencia adicional se llama resistencia de la torta (Shi et al., 2014). La morfología de la torta de ensuciamiento dicta la disminución del flujo, mientras que la interacción entre la capa de torta y la superficie de la membrana determina la reversibilidad del ensuciamiento (Schäfer y Fane, 2021). Finalmente, la resistencia de Fouling se define como la resistencia total de ensuciamiento en donde se concentran tanto resistencias reversibles como irreversibles, independientemente del mecanismo de ensuciamiento que se

esté presentando al momento de la ultrafiltración (Crittenden et al., 2017). Se puede observar que la membrana de 1kDa presenta mayor resistencia de Fouling, esto se debe fundamentalmente a mecanismos de ensuciamiento reversibles, los cuales no afectan químicamente la estructura de la membrana y pueden ser retirados de manera física o química de la misma (Shi et al., 2014).

### Efecto de la separación con membranas sobre las actividades

La actividad de antioxidante contra el radical ABTS catiónico muestra la capacidad del hidrolizado y las fracciones peptídicas para actuar como donantes de hidrógeno o de electrones en las reacciones de los radicales libres. La actividad antioxidante de los péptidos depende considerablemente de la abundancia de aminoácidos no aromáticos, así como de su posición en la secuencia peptídica (Pezeshk et al., 2019). En la figura 3 se observan los valores para la capacidad antioxidante equivalente en trolox (TEAC) y la capacidad antioxidante de absorber radicales de oxígeno (ORAC), por sus siglas en inglés, en donde se compara el hidrolizado enzimático de lombriz roja californiana completo contra las fracciones obtenidas mediante UFT. Se puede observar que la fracción menor de 1kDa es la que presenta menor actividad, seguida de la fracción mayor a 3 kDa en la actividad TEAC. Mientras que para ORAC la que presentan menor actividad es la fracción mayor a 3kDa y posteriormente la fracción mayor a 1kDa. Adicionalmente podemos identificar que la fracción menor a 3kDa es la que presenta la mejor capacidad antioxidante para ambas pruebas, siendo mayor que el hidrolizado completo y las demás fracciones. Estos resultados indican que los péptidos con mayor actividad antioxidante por estos dos mecanismos, se encuentran en el rango entre 1 y 3 kDa. Resultados similares fueron reportados por Pezeshk et al., (2019) los cuales obtuvieron fracciones peptídicas a partir de las vísceras del atún de aleta amarilla (*Thunnus albacores*) mediante ultrafiltración de membranas, y evaluaron la actividad antioxidante y antibacteriana de las fracciones, encontrando que los péptidos menores a 3kDa presentan las mejores capacidades antioxidantes expresadas en términos de DPPH y TEAC.

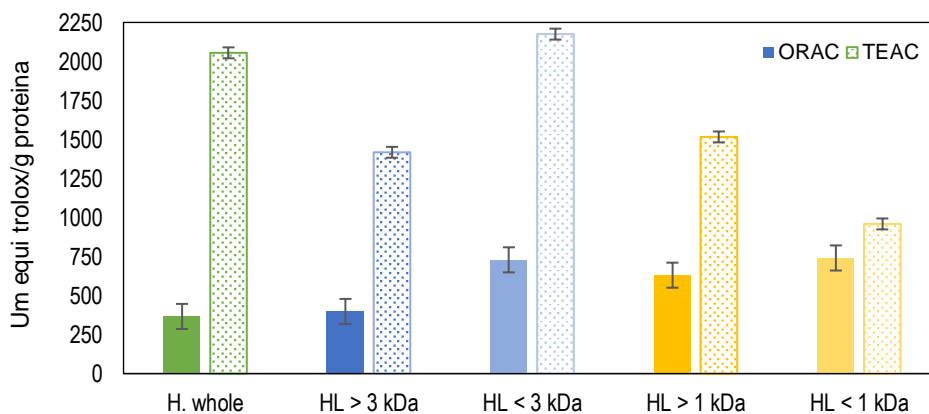


Fig. 3: Actividad antioxidante TEAC y ORAC

Con respecto a la capacidad antioxidante de reducción de hierro (FRAP), figura 4 muestra que el hidrolizado completo y la fracción menor a 3kDa no presentan diferencias estadísticamente significativas mediante una prueba de diferencia de medias, y al igual que con la actividad TEAC las fracciones mayores tanto de 3 como de 1 kDa son las que presenta las menores actividades biológicas. Es decir, los péptidos con mayor actividad según este mecanismo también están en el rango entre 1 y 3 kDa.

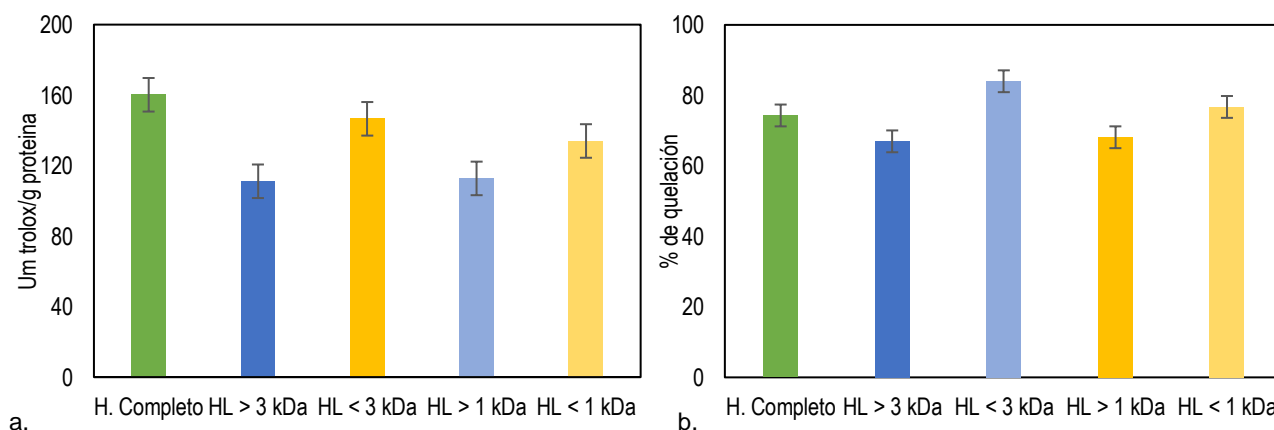


Fig. 4: a. Actividad antioxidante FRAP b. Porcentaje de quelación de hierro



Estos valores son superiores a los reportados por Sierra y Zapata, (2021) los cuales optimizaron las condiciones de hidrólisis enzimática de proteína de escamas de pescado presentando una actividad antioxidante FRAP de hasta 40  $\mu\text{m}$  equivalente trolox por gramo de proteína hidrolizada, lo que nos indica que tanto el hidrolizado de lombriz roja California, como sus fracciones presentan altos niveles de esta actividad en comparación con otros sustratos.

Con respecto a la actividad quelante de hierro (figura 4B) se observa la misma tendencia que se obtuvo para las actividades antioxidantes TEAC y ORAC, siendo la fracción menor a 3kDa la que presenta el mayor porcentaje de quelación de hasta un 85%. La capacidad quelante de hierro presenta una relación directa con las actividades antioxidantes puesto que el hierro es un catalizador de diferentes reacciones oxidativas en el organismo. El hierro puede iniciar o mantener reacciones inflamatorias e incluso dañar tejidos mediante la formación de radicales libres. Así, en la reacción de Haber- Weiss se originan radicales hidroxilos a partir de oxígeno. El valor obtenido en el presente estudio (85%) se encuentra por encima de los valores reportados para péptidos obtenidos por ultrafiltración con membranas procedentes de hidrolizados de proteínas de harina de frijol, los cuales presentan en sus fracciones con mayor actividad quelante hasta un 45%, demostrando que la fracción <3kDa de hidrolizados de lombriz roja californiana presentan excelentes cualidades para la quelación de hierro y puede ser una alternativa de uso en diferentes matrices (Sonklin et al., 2018).

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de este estudio y de su discusión, de la comparación con resultados de otros autores y del detallado análisis presentado se pueden extraer las siguientes tres conclusiones principales: 1) El hidrolizado de lombriz roja californiana y las fracciones obtenidas por ultrafiltración tangencial de flujo cruzado presentan actividad antioxidante con gran potencial para inhibir desde diferentes mecanismos la oxidación por especies reactivas del oxígeno, adicionalmente presentan propiedades quelantes que influyen positivamente en la reducción de la oxidación captando iones como el hierro que son cofactores en dichas reacciones. 2) La fracción <3kDa muestra las mayores capacidades antioxidantes equivalente en trolox (TEAC) así como la capacidad de captar radicales de oxígeno (ORAC) mientras que el potencial de reducción de hierro no presenta una diferencia con el hidrolizado completo. 3) Los mecanismos de ensuciamiento en las membranas de ultrafiltración no presentan un ajuste perfecto de los modelos, pero se encontró que el principal mecanismo es el bloqueo completo de poros para la membrana de 1 kDa y la formación de torta para la membrana de 3kDa. 4) El proceso de ultrafiltración tangencial de hidrolizados proteicos de lombriz roja californiana en membranas de 1 kDa presentan una mayor reducción en el flujo de permeado en comparación con la membrana de 3kDa, fundamentalmente por los diferentes mecanismos de ensuciamiento irreversibles asociados a la interacción entre las moléculas del sustrato y la membrana produciendo un bloqueo completo en los poros de esta.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Comité para el Desarrollo de la Investigación en la Universidad de Antioquia (CODI) a través del programa de sostenibilidad y de MINCIENCIAS mediante la convocatoria para el fortalecimiento de conocimiento en instituciones de educación superior públicas (Código de Proyecto 82040).

## NOTACIÓN

### Abreviaciones

AOAC= Association of Official Analytical Chemists

CQH = capacidad quelante de hierro

GH= Grado de hidrólisis

FRAP = Ferric ion Reducing Antioxidant Power

ORAC= Oxygen Radical Absorbance Capacity

PTM= Presión transmembrana

TEAC = Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

UF= Ultrafiltración

### Simbolos

A0= absorbancia del control

AS = absorbancia de la muestra

k= Constante de ensuciamiento

R<sup>2</sup>= Coeficiente de correlación

$\Delta P$  = Diferencia de presión

h= Enlaces peptídicos hidrolizados

ht= Enlaces peptídicos totales

Jwi = Flujo de permeado de agua destilada

Jww= Flujo de permeado del fluido de trabajo

J= Flujo de salida del permeado

$\alpha$  = Grado de disociación

MP= Masa de proteína

n= Mecanismo de ensuciamiento

Rf= Resistencia de Fouling

Rm= Resistencia intrínseca

Rif= Resistencia irreversible

Rt= Resistencia total

$\Sigma R$  = Suma de resistencias

Ref= Resistencia reversible

T= Temperatura

t= Tiempo de filtrado

$\mu$  = Viscosidad

B= Volumen de hidróxido de sodio

V= Volumen de permeado

## REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J., *Enzymic hydrolysis of food protein*, Elsevier Applied Science Publishers, 116-124 (1985)
- Ahmed, Z., y Wang, Z., Investigating the impact of human capital on the ecological footprint in India: An empirical analysis, <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05911-7>, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 26(26), 26782–26796 (2019)
- Ali, D., Husein, M. M., y Harding, T. G., Produced water treatment by micellar-enhanced ultrafiltration, <https://doi.org/10.1021/es902862j>, *Environ. Sci. Technol.*, 44(5), 1767–1772 (2010)
- Azmi, N., Hashim, P., y otros 3 autores, Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent, <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1166>, *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.*, 4(Suppl 1), S348–S352 (2014)
- Balamurugan, M., Parthasarathi, K., y otros dos autores, Hypothetical mode of action of earthworm extract with hepatoprotective and antioxidant properties, <https://doi.org/10.1631/jzus.B0720194>, *J Zhejiang Univ Sci B*, 9(2), 141–147 (2008)
- Benítez, R., Ibarz, A., y Pagan, J., Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. Protein hydrolysates: processes and applications, <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v42n2/v42n2a08.pdf>, *Acta. Bioquím. Clín. Latinoam.*, 42(2), 227–236 (2008)
- Benzie, I., y Strain, J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>, *Anal. Biochem.*, 239(1), 70–76 (1996)
- Blanpain-Avet, P., Migdal, J. F., y Bénézec, T., The effect of multiple fouling and cleaning cycles on a tubular ceramic microfiltration membrane fouled with a whey protein concentrate. Membrane performance and cleaning efficiency, <https://doi.org/10.1205/fbio.82.3.231.44182>, *Food Bioprod. Process.*, 82(3 C), 231–243 (2004)
- Crittenden, C., Rhodes, R., y otros dos autores, *MHW’s Water Treatment Principles and Design*. 3<sup>er</sup> Ed, John Wiley and Sons, ISBN 978-1-118-10377-7, United States of America (2017)
- Daroit, D. J., y Brandelli, A., *In vivo* bioactivities of food protein-derived peptides – a current review, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.002>, *Curr. Opin. Food Sci.*, 39, 120–129 (2021)
- Decker, E. A., y Welch, B., Role of Ferritin as a Lipid Oxidation Catalyst in Muscle Food, <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>, *J. Agric. Food Chem.*, 38(3), 674–677 (1990)
- Gómez, L. J., y Zapata, J. E., Efecto del Nivel de Grasa y Velocidad de Agitación en la Hidrolisis Enzimática de Vísceras de Tilapia Roja (*Oreochromis* sp.), <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000400007>, *Informacion Tecnológica*, 28(4), 47–56 (2017)
- Heller, M. C., y Keoleian, G. A., Greenhouse Gas Emission Estimates of U.S. Dietary Choices and Food Loss, <https://doi.org/10.1111/jiec.12174>, *J. Ind. Ecol.*, 19(3), 391–401 (2015)
- Li-Chan, C., Bioactive peptides, and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients, <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.09.005>, *Curr. Opin. Food Sci.*, 1(1), 28–37. (2015)
- Muller, M., Uebel, A., y otros ocho autores, Study of Different Conditions of Enzymatic Hydrolysis in Earthworms, <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1278754>, *Int. J. New Technol. Res.*, 3(11), 263202 (2017)
- Ou, B., Maureen, W., y Prior, L., Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe, <https://doi.org/10.1021/jf010586o>, *J. Agric. Food Chem.*, 49(295–6615), 4619–4626 (2001)
- Paoletti, G., Buscardo, E., y otros nueve autores, Nutrient content of earthworms consumed by Ye’Kuana Amerindians of the Alto Orinoco of Venezuela, <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2141>, *Proc. Royal Soc. B*, 270(1512), 249–257 (2003)
- Pezeshk, S., Ojagh, M., y otros dos autores, Fractionation of Protein Hydrolysates of Fish Waste Using Membrane Ultrafiltration: Investigation of Antibacterial and Antioxidant Activities, <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9483-y>, *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 11(3), 1015–1022 (2019)
- Qin, L., Shi, X., y Xia, X., Study on enzymatic technology of earthworm peptides produced by Alcalase, <http://dx.doi.org/10.1080/10242422.2017.1278754>, *J. Guizhou Agric. Sci.*, 8, 160–163 (2010)
- Re, R., Pellegrini, N., y otros cuatro autores, Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay, [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3), *Free Radic. Biol. Med.*, 26(9/10), 1231–1237 (1999).
- Rodrigues, M., Carlesso, M., y otros ocho autores, Enzymatic hydrolysis of the *Eisenia andrei* earthworm: Characterization and evaluation of its properties, <https://doi.org/10.1080/10242422.2017.1278754>, *Biocatal. Biotransformation*, 35(2), 110–119 (2017)
- Schäfer, A. I., y Fane, A. G., *Nanofiltration Principles, Applications, and New Materials*, 2<sup>er</sup> Ed, In Wiley-VCH (2021)
- Seyed-Shahabadi, M., y Reyhani, A., Optimization of operating conditions in ultrafiltration process for produced water treatment via the full factorial design methodology, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.04.051>, *Sep. Purif. Technol.*, 132(April), 50–61 (2014)

Shi, X., Tal, G., y otros dos autores, Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review, <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2014.04.003>, J. Water Process. Eng., 1, 121–138 (2014)

Sierra-Lopera, M., y Zapata-Montoya, E., Optimization of enzymatic hydrolysis of red tilapia scales (*Oreochromis* sp.) to obtain bioactive peptides, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00611>, Biotechnology Reports, 30, e00611 (2021)

Sonklin, C., Laohakunjit, N., y Kerdchoechuen, O., Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates, <https://doi.org/10.7717/peerj.5337>, Peer. J., 2018(7) (2018)

Suarez, L. M., Fan, H., y otros dos autores, Optimization of Enzymatic Hydrolysis for Preparing Cassava Leaf Hydrolysate with Antioxidant Activity, <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02693-0>, Food Bioproc. Tech., 14(12), 2181–2194 (2021)

Sun, Z., Earthworm as a biopharmaceutical: from traditional to precise, <https://doi.org/10.18088/ejbmr.1.2.2015.pp28-35>, Eur. J. Med. Res, 1(2), 28 (2015)

Tomczak, W., y Gryta, M., Application of ultrafiltration ceramic membrane for separation of oily wastewater generated by maritime transportation, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.118259>, Sep. Purif. Technol, 261(December 2020), 118259 (2021)

Wang, Z., Ma, J., y otros cuatro autores, Membrane cleaning in membrane bioreactors: A review, <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.05.060>, J. Membr. Sci., 468, 276–307 (2014)

Página en blanco