



Universitat de Girona

REVALORACIÓ DE LA FRACCIÓ CEL·LULAR DE LA SANG DE PORC PROCEDENT D'ESCORXADORS INDUSTRIALS

Mònica TOLDRÀ i ALEGRET

ISBN: 84-688-1296-X

Dipòsit legal: GI-90-2005

<http://hdl.handle.net/10803/7783>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària
Institut de Tecnologia Agroalimentària

TESI DOCTORAL

**REVALORACIÓ DE LA FRACCIÓ CEL·LULAR
DE LA SANG DE PORC PROCEDENT
D'ESCORXADORS INDUSTRIALS**

Mònica Toldrà i Alegret

2002



Universitat de Girona

Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària
Institut de Tecnologia Agroalimentària

REVALORACIÓ DE LA FRACCIÓ CEL·LULAR DE LA SANG DE PORC PROCEDENT D'ESCORXADORS INDUSTRIALS

Memòria presentada per optar al grau de doctor per la Universitat de Girona, per

Mònica Toldrà i Alegret

juliol 2002

Carmen Carretero Romay, Professora Titular de l'Àrea de Tecnologia dels Aliments del Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària de la Universitat de Girona,

CERTIFICA:

Que la llicenciada en Veterinària Mònica Toldrà Alegret ha portat a terme, sota la seva direcció, a l'Àrea de Tecnologia dels Aliments de la Universitat de Girona, el treball titulat **“Revaloració de la fracció cel·lular de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials”**, que presenta en aquesta memòria la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de doctor.

I per a què consti als efectes oportuns, signa la present a Girona, el 9 de juliol de 2002.

Vist-i-plau
Directora de la Tesi

Dra. Carmen Carretero Romay

Agraïments

Vull expressar el meu sincer agraïment a totes aquelles persones i entitats que han fet possible la realització d'aquest treball.

En primer lloc a la Dra. Carme Carretero, directora d'aquesta tesi, per haver confiat en mi i haver-me estimulat, introduït i guiat en la recerca. Per la seva supervisió i dedicació, pels seus consells savis, explicacions i l'aclariment de dubtes. Pel suport que m'ha donat durant tot el temps que ha durat la part experimental i durant la redacció, fins i tot en moments dolents o sota tensió pels nervis de l'últim moment. També vull agrair-li el seu recolzament, els ànims i que sempre m'ha encoratjat a tirar endavant i molt especialment, la minuciosa revisió i correcció del text. Moltes gràcies, jefa!

A les companyes i companys de Tecnologia dels Aliments, per tot el que hem compartit i pel seu suport: "las chicas de Tecno" Dolors, Anna Maria, Lucero, Elena i Carme, als antics companys Ferran Ribas i Joan de Gracia i als nous de "Molecular" Maria Pla i David Rodríguez. A la Dolors Parés m'agradaria agrair-li el seu recolzament, la seva dedicació, paciència i, des del principi, haver-me ensenyat tantes coses del treball al laboratori, tècniques analítiques, informàtica, estadística, interpretació de resultats, etc. Pels seus bons consells i per fer-me de "germana" gran i d'amiga. A l'Elena Saguer, per la seva col·laboració en la part experimental i la gran ajuda amb el SAS, per aclarir-me molts dubtes relacionats amb el tractament estadístic de les dades (ets una crack) i per compartir el despatx. A l'Anna Maria Aymerich, moltes gràcies per la teva ajuda en la part experimental, preparació de reactius, comandes, recollida de mostres de sang a l'escorxador, viatges a la UAB, etc. Per les bones estones que ens han alegrat la feina, pel teu suport als moments dolents i per la teva amistat i generositat. Què fariem sense tu? Saps el què et vull dir? A la Lucero Zamora, per compartir el despatx, ordinadors, material, equips del laboratori, bromes, bogeria sana, per riure juntes, pel seu suport, la seva amistat i generositat durant tot aquest temps. Pel seu recolzament i per ser tan bona gent. Gràcies Ranchera i molta sort amb els làctics! A la Rebeca Jiménez, per la seva gran ajuda al laboratori amb els hidrolitzats, pel seu suport, per saber escoltar i tenir sempre un bon consell a ma. Et trobarem molt a faltar!...pero nos vemos en Aguatalco (espero).

Als companys del Departament d'EQATA i de l'INTEA per compartir espais, equips, material, etc. i per les bones estones que hem passat junts, sobretot al menjador: Anna (per la seva amistat i amabilitat), Nuri (per ser tan guai, la millor companya de pis i pels dinars de l'àvia dels dilluns), M^a Àngels (el teu somriure anima molt), Esther (Hola reina!), I sidre, Cun, Jordi Cabrefiga, Jesús, Ferran, Jaume, Joan XlaP (per la seva gran ajuda amb la informàtica i les ANN), Lúdia, Lusi, Olga, Sussi, Rosa, Gemma, Jordi Cervantes, Josep Lluís, Marta Gou, Fabiola, Sussana Presta, Farnés, Mari Carmen, Marta Pujol, Elena Fulladosa.

Als companys de PV, Anna, Isidre i Cun, per resoldre'm molts dubtes de l'ANOVA i el JMP, a l'Esther i al Jordi per la seva inestimable ajuda amb el bioscreen, les fotos, l'escàner, l'analitzador d'imatges pels gels, etc. Al Josep Pereda, pels seus súper muntatges i invents.

A la Sussi Santaulària, Carme Dilmé, Lourdes Coderch, Alda Carreras i Cristina Núñez, per la seva gran ajuda en diversos aspectes administratius i burocràtics.

També estic molt agraïda als TFCs: Esther Busquets, Ferran Piferrer, Pere Felip, Anna Busquets, Cristina Santamaria, Judit Capdevila, Arnau Elias, Carles Lorca i Sergi Altarriba, per la seva gran col·laboració en diverses parts d'aquest treball durant el desenvolupament dels seus projectes final de carrera. També a l'Elisabet Sánchez, Manel Duran, Sergi Turon, Maria Guajardo, Sergi Carreras i Aurora Piñero per compartir el laboratori durant el temps que han estat entre nosaltres.

A l'Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) i al Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària (EQATA) de la Universitat de Girona per haver-me proporcionat les instal·lacions i els mitjans necessaris per a dur a terme aquest treball.

Al Dr. Emili Montesinos, per deixar-me utilitzar el Bioscreen, el JMP del Machintosh, etc. Al Dr. Joan Saurina del Departament d'Enginyeria Industrial de la UdG per deixar-nos utilitzar l'equip DSC. Al Dr. Buenaventura Guamis del Centre Especial de Recerca-Planta de Tecnologia dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la UAB, per deixar-nos utilitzar l'equip HHP. Al Josep Yuste (Yuyu) i al Joan Miquel per la seva amable ajuda amb els tractaments HHP. A l'escorxador Frigorífics Costa Brava que ens ha facilitat les mostres de sang utilitzades en l'estudi i a l'empresa Novozymes, per haver-nos donat gentilment els enzims.

I als meus pares, al meu germà i als amics, MOLTES GRÀCIES per tot.

A tots ells el meu agraïment.

El treball que representa aquesta memòria s'ha realitzat en el marc de les ajudes a Grups de Recerca Consolidats de Catalunya (SGR) de la Generalitat de Catalunya amb Refs. 1998SGR00093, 2000SGR00095 i 2001SGR000293, amb fons del Centre de Referència en Tecnologia dels Aliments (CeRTA) de la Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica (CIRIT) de la Generalitat de Catalunya destinats a la Unitat de Tecnologia Agroalimentària (TAG) pel projecte "Aprofitament de subproductes de la Indústria carnia" i amb el finançament del projecte "Desarrollo de ingredientes alimentarios a partir de fracciones de sangre de cerdo sometidas a alta presión hidrostática" amb Ref. ALI99-1055-C02-01 del Programa Nacional de I+D+I de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT).

Índex

Capítol 1 Introducció	3
1.1 Els subproductes de la indústria càrnia	3
1.2 La sang de porc	5
1.3 Revaloració i aprofitament de la sang	6
1.3.1 Sistemes de recollida de la sang a l'escorxador	8
1.3.1.1 Sang veterinària	8
1.3.1.2 Sang higiènica	8
1.3.2 Valor nutritiu de la sang	10
1.3.3 Propietats funcionals de la sang	10
1.4 Fracció plasmàtica	11
1.5 Fracció cel·lular	12
1.5.1 L'hemoglobina	13
1.5.2 Valor nutritiu de l'hemoglobina i la globina	15
1.5.3 Propietats funcionals de l'hemoglobina i la globina	15
1.5.4 Utilització de la fracció cel·lular	16
1.6 Objectius generals i estructuració del treball	17
Capítol 2 Conservació de la fracció cel·lular mitjançant la deshidratació per atomització i caracterització del producte en pols	21
2.1 INTRODUCCIÓ	21
2.2 OBJECTIUS	23
2.3 MATERIAL I MÈTODES	24
2.3.1 Disseny experimental	24
2.3.2 Procedència de les mostres de sang	26
2.3.3 Obtenció de la fracció cel·lular hemolitzada en pols	26
2.3.3.1 Obtenció de la fracció cel·lular	26
2.3.3.2 Hemòlisi de la fracció cel·lular	27
2.3.3.3 Deshidratació per atomització de la fracció cel·lular hemolitzada	28
2.2.4 Determinació de les condicions del procés de deshidratació per atomització de la fracció cel·lular hemolitzada	29
2.2.4.1 Contingut en humitat	31
2.2.4.2 Solubilitat proteica	31
2.2.4.3 Anàlisi calorimètrica per DSC	31
2.2.5 Caracterització microbiològica de la fracció cel·lular	33
2.2.5.1 Recompte de microorganismes aerobis mesòfils	33
2.2.5.2 Recompte de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
2.2.5.3 Recompte de Clostridis sulfit reductors	34
2.2.6 Caracterització físico-química de la fracció cel·lular hemolitzada i deshidratada per atomització	35

2.2.6.1	Composició química de la fracció cel·lular en pols	35
2.2.6.2	Caracterització dels paràmetres de color de la fracció cel·lular en pols	36
2.2.7	Activitat de l'aigua i isoterms de sorció de la fracció cel·lular hemolitzada i deshidratada per atomització	38
2.2.7.1	Determinació de l'activitat de l'aigua	38
2.2.7.2	Determinació experimental de les isoterms de sorció	40
2.2.7.3	Isoterma d'adsorció de la fracció cel·lular deshidratada per atomització segons el model GAB (Guggenheim-Anderson-De Boer)	41
2.2.8	Tractament estadístic de les dades	42
2.4	RESULTATS I DISCUSSIÓ	43
2.4.1	Determinació de les condicions de deshidratació per atomització de la fracció cel·lular de la sang de porc	43
2.4.1.1	Contingut en humitat en funció de la temperatura de deshidratació	43
2.4.1.2	Influència de la temperatura de deshidratació sobre la solubilitat proteica	45
2.4.1.3	Anàlisi calorimètrica de la fracció cel·lular per DSC	47
2.4.1.4	Discussió global de la determinació de les condicions de deshidratació de la fracció cel·lular per atomització	52
2.4.2	Caracterització microbiològica de la fracció cel·lular	52
2.4.2.1	Recompte de microorganismes aerobis mesòfils viables	53
2.4.2.2	Investigació i recompte de <i>Staphylococcus aureus</i>	56
2.4.2.3	Investigació i recompte de Clostridis sulfit reductors	58
2.4.2.4	Discussió global de la caracterització microbiològica de la FC en pols	59
2.4.3	Caracterització físico-química de la fracció cel·lular hemolitzada i deshidratada per atomització	60
2.4.3.1	Composició química de la fracció cel·lular en pols	60
2.4.3.2	Caracterització dels paràmetres del color de la fracció cel·lular en pols	62
2.4.4	Activitat de l'aigua i isoterms de sorció de la fracció cel·lular hemolitzada i deshidratada per atomització	63
2.5	CONCLUSIONS	77
Capítol 3	Estabilització del color de la fracció cel·lular deshidratada per atomització per utilitzar-la com a colorant alimentari	81
3.1	INTRODUCCIÓ	81
3.2	OBJECTIUS	83
3.3	MATERIAL I MÈTODES	83
3.3.1	Disseny experimental	83

3.3.2	Addició dels antioxidants a la fracció cel·lular i deshidratació de les mostres per atomització	84
3.3.3	Determinació del color	85
3.3.4	Tractament estadístic de les dades	85
3.4	RESULTATS I DISCUSSIÓ	85
3.4.1	Efecte de l'addició d'àcid ascòrbic	85
3.4.2	Efecte de l'addició de dextrina	90
3.4.3	Efecte de l'addició de glucosa	92
3.4.4	Efecte de l'addició de L-cisteïna	94
3.4.5	Efecte de l'addició d'àcid nicotínic	98
3.4.6	Efecte de l'addició de nicotinamida	101
3.5	CONCLUSIONS	103
Capítol 4	Higienització de la fracció cel·lular mitjançant el tractament amb altes pressions hidrostàtiques	107
4.1	INTRODUCCIÓ	107
4.2	OBJECTIUS	110
4.3	MATERIAL I MÈTODES	111
4.3.1	Procedència de les mostres	111
4.3.2	Tractament amb altes pressions hidrostàtiques	111
4.3.3	Contaminació microbiològica	113
4.3.3.1	Recompte de microorganismes aerobis mesòfils	113
4.3.3.2	Capacitat de creixement de la microbiota contaminant	113
4.3.4	Color CIE L*a*b*	114
4.3.5	Solubilitat proteica	114
4.3.6	Viscositat	115
4.3.7	Determinació de les propietats funcionals	115
4.3.7.1	Solubilitat proteica	117
4.3.7.2	Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma	117
4.3.7.3	Activitat emulsionant	118
4.3.7.4	Formació de pastes per escalfament	118
4.3.8	Anàlisi estadística de les dades	120
4.4	RESULTATS I DISCUSSIÓ	121
4.4.1	Efectes del tractament HHP sobre la microbiota contaminant de la fracció cel·lular	127
4.4.2	Efectes del tractament HHP sobre els paràmetres CIE L*a*b* del color de la fracció cel·lular	130
4.4.3	Efectes del tractament HHP sobre la solubilitat proteica de la fracció cel·lular	133
4.4.4	Efectes del tractament HHP sobre la reologia de la fracció cel·lular	136

4.4.5 Propietats funcionals de la fracció cel·lular higienitzada per altes pressions i deshidratada per atomització	138
4.4.5.1 Solubilitat proteica	140
4.4.5.2 Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma	141
4.4.5.3 Activitat emulsionant	145
4.4.5.4 Textura (TPA) i capacitat de retenció d'aigua (CRA) de les pastes obtingudes per escalfament	148
4.5 CONCLUSIONS	152
Capítol 5 Obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats a partir de la fracció cel·lular	157
5.1 INTRODUCCIÓ	157
5.2 OBJECTIUS	161
5.3 MATERIAL I MÈTODES	162
5.3.1 Procedència de les mostres	162
5.3.2 Enzims proteolítics utilitzats per hidrolitzar l'hemoglobina	162
5.3.3 Hidròlisi enzimàtica	164
5.3.4 Grau d'hydròlisi	165
5.3.5 Percentatge de nitrogen no proteic	167
5.3.6 Experiments preliminars	167
5.3.7 Aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre l'obtenció d'hidrolitzats proteics de la fracció cel·lular	169
5.3.7.1 Disseny experimental	169
5.3.7.2 Caracterització dels hidrolitzats	171
5.3.7.3 Anàlisi dels pèptids obtinguts als hidrolitzats proteics mitjançant electroforesi SDS-PAGE	171
5.3.8 Deshidratació per atomització dels hidrolitzats T+P de la fracció cel·lular	173
5.3.9 Caracterització físico-química i microbiològica dels hidrolitzats T+P d'hemoglobina	174
5.3.10 Determinació de les propietats funcionals dels hidrolitzats T+P d'hemoglobina deshidratats per atomització	175
5.3.11 Tractament estadístic de les dades	176
5.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ	176
5.4.1 Experiments preliminars per a l'obtenció d'hidrolitzats a partir de l'Hb	176
5.4.2 Efectes de l'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre l'obtenció d'hidrolitzats proteics de l'Hb	180
5.4.3 Deshidratació per atomització dels hidrolitzats T+P de fracció cel·lular	187
5.4.4 Caracterització físico-química i microbiològica dels hidrolitzats T+P de FC deshidratats per atomització	189
5.4.5 Propietats funcionals dels hidrolitzats T+P de FC deshidratats per atomització	192

5.4.5.1 Solubilitat proteica	192
5.4.5.2 Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma	194
5.4.5.3 Activitat emulsionant	196
5.5 CONCLUSIONS	199
Conclusions del treball	205
Bibliografia	211
Annexos	227
Annex 1: Conservació de la fracció cel·lular mitjançant la deshidratació i caracterització del producte en pols	227
Annex 2: Estabilització del color de la fracció cel·lular deshidratada per atomització per utilitzar-la com a colorant alimentari	229
Annex 3: Higienització de la fracció cel·lular mitjançant el tractament amb altes pressions hidrostàtiques	233
Annex 4: Obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats a partir de la fracció cel·lular	243

Llistat de Figures

Capítol 1: Introducció

Figura 1.1: Diferents fraccions de la sang.	5
Figura 1.2: Sistema de recollida higiènica de la sang d'escorxador i detall del ganivet utilitzat.	9
Figura 1.3: Fotografia SEM dels eritròcits de la fracció cel·lular de la sang.	13
Figura 1.4: Diagrama esquemàtic de l'hemoglobina mostrant l'estructura dels grups hemo associats.	14
Figura 1.5: Formes de l'hemoglobina en funció de l'estat del grup hemo i de la concentració d'oxigen, mostrant el color característic de cadascuna.	14

Capítol 2: Conservació de la fracció cel·lular mitjançant la deshidratació per atomització i caracterització del producte en pols

Figura 2.1: Esquema de l'equip de deshidratació per atomització	29
Figura 2.2: Diagrama de flux del procés tecnològic d'obtenció de la FC hemolitzada (concentrat d'Hb) deshidratada per atomització.	30
Figura 2.3: Representació tridimensional del sòlid de color segons l'espai de color CIE $L^* a^* b^*$.	37
Figura 2.4: Diagrama de Cromaticitat a^* , b^* que representa la visió d'un tall horitzontal del sòlid de color a un valor de L^* constant.	37
Figura 2.5: Esquema del dispositiu utilitzat per a la determinació de l' a_w i de les isoterms de sorció pel mètode gravimètric.	39
Figura 2.6: Percentatge d'humitat de la FC deshidratada (g d'aigua per 100 g de pols) en funció de la temperatura de deshidratació.	44
Figura 2.7: Solubilitat proteica (%) a pH 7,5 de la FC en pols en funció de la temperatura de deshidratació.	47
Figura 2.8: Termogrames obtinguts per DSC de mostres de 100 μ L de FC fresca de sang de porc i de FC en pols deshidratades per atomització a diferents temperatures.	48
Figura 2.9: Recompte de microorganismes aerobis mesòfils de la FC fresca, FC hemolitzada per ultrasons i FC hemolitzada i deshidratada per atomització.	54
Figura 2.10: Recomptes de <i>S. aureus</i> de la FC hemolitzada i a la FC hemolitzada i deshidratada per atomització.	57
Figura 2.11: Recomptes de clostridis sulfít reductors de la FC hemolitzada i a la FC hemolitzada i deshidratada per atomització.	59

Figura 2.12: Representació de les velocitats relatives d'alteració dels aliments en funció de l' a_w i les propietats de sorció d'humitat dels productes alimentaris.	67
Figura 2.13: Representació esquemàtica de les isoterms de sorció mostrant el fenomen de la histèresi.	69
Figura 2.14: Isothermes de sorció a 20°C de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C.	72
Figura 2.15: Relació entre a_w/m i l' a_w (a 20°C) de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C per calcular els coeficients de regressió α , β i γ .	74
Figura 2.16: Isotherma d'adsorció a 20°C de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C obtinguda segons el model GAB (Guggenheim, Anderson i De Boer).	75
Capítol 3: Estabilització del color de la fracció cel·lular deshidratada per atomització per utilitzar-la com a colorant alimentari	
Figura 3.1: Evolució del paràmetre L^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid ascòrbic.	87
Figura 3.2: Evolució del paràmetre a^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid ascòrbic.	88
Figura 3.3: Evolució del paràmetre b^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid ascòrbic.	88
Figura 3.4: Evolució del paràmetre L^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de dextrina.	90
Figura 3.5: Evolució del paràmetre a^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de dextrina.	91
Figura 3.6: Evolució del paràmetre b^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de dextrina.	91
Figura 3.7: Evolució del paràmetre L^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de glucosa.	93
Figura 3.8: Evolució del paràmetre a^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de glucosa.	93
Figura 3.9: Evolució del paràmetre b^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de glucosa.	94
Figura 3.10: Evolució del paràmetre L^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de L-Cisteïna.	95
Figura 3.11: Evolució del paràmetre a^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de L-Cisteïna.	96

Figura 3.12: Evolució del paràmetre b^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de L-Cisteïna.	96
Figura 3.13: Evolució del paràmetre L^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid nicotínic.	98
Figura 3.14: Evolució del paràmetre a^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid nicotínic.	99
Figura 3.15: Evolució del paràmetre b^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid nicotínic.	100
Figura 3.16: Evolució del paràmetre L^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de nicotinamida.	101
Figura 3.17: Evolució del paràmetre a^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de nicotinamida.	102
Figura 3.18: Evolució del paràmetre b^* en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de nicotinamida.	102
 Capítol 4: Higienització de la fracció cel·lular mitjançant el tractament amb altes pressions hidrostàtiques	
Figura 4.1: Esquema d'un equip discontinu d'alta pressió hidrostàtica.	110
Figura 4.2: Mostres de fracció cel·lular hemolitzada envasades abans del tractament HHP i detall del cilindre de pressurització de la premsa isostàtica discontinua utilitzada.	112
Figura 4.3: Corba estàndard d'un assaig de TPA on es mostren els diferents paràmetres calculats.	120
Figura 4.4: Recòmptes de microorganismes mesòfils de la FC no tractada (control), de la FC sotmesa a 400 MPa, a 20 i 40°C durant 5 i 15 minuts i de la FC sotmesa a 450 MPa a 20°C durant 5 min.	122
Figura 4.5: Corbes de creixement a 31°C dels microorganismes de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa i a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts.	123
Figura 4.6: Temps de detecció (hores) del creixement de la microbiota contaminant de la FC no tractada (control) i la FC sotmesa a 400 MPa i a 20 °C durant 5, 15 i 30 minuts.	124
Figura 4.7: Recòmptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts.	125
Figura 4.8: Solubilitat a pH 7 i a pH 4,5 de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa i a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts.	125
Figura 4.9: Viscositat a 25°C de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts.	126

Figura 4.10: Esquema del procediment experimental dut a terme per establir les condicions òptimes de temperatura i temps per aplicar el tractament HHP a 400 MPa a la fracció cel·lular hemolitzada.	126
Figura 4.11: Recomptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa en funció de la temperatura (5, 20 i 40°C) i el temps (5 i 15 minuts) de tractament.	127
Figura 4.12: Corbes de creixement a 31°C dels microorganismes de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa, a 5, 20 i 40°C durant 5 i 15 minuts.	129
Figura 4.13: Solubilitat proteica a pH 7 i a pH 4,5 de la FC hemolitzada no tractada (control) i de les mostres de FC sotmeses a 400 MPa a tres temperatures (5, 20 i 40°C) durant 5 i 15 minuts.	134
Figura 4.14: Representació esquemàtica del diagrama de fase pressió/temperatura per a la desnaturalització de les proteïnes.	135
Figura 4.15: Viscositat a 25°C de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa a tres temperatures (5, 20 i 40°C) durant 5 i 15 minuts.	137
Figura 4.16: Recomptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC no tractada (control) i de la FC tractada per HHP, abans i després de la deshidratació per atomització.	139
Figura 4.17: Solubilitat proteica (%) a pH 4,5 i pH 7 de la FC tractada per HHP i la FC no tractada (control) deshidratades per atomització.	141
Figura 4.18: Capacitat escumant (volum escuma en mL) a pH 4,5 i pH 7 de la FC tractada per HHP i la FC no tractada (control) deshidratades per atomització.	142
Figura 4.19: Estabilitat de l'escuma (%) a pH 4,5 i pH 7, formada amb FC tractada per HHP i FC no tractada (control) deshidratades per atomització.	144
Figura 4.20: Activitat emulsionant (absorbància a 500 nm) a pH 4,5 i pH 7 de la FC tractada per HHP i la FC no tractada (control) deshidratades per atomització en funció de la concentració de FC (p/v).	146
Figures 4.21 A, B i C: Paràmetres del TPA de les pastes obtingudes a pH 4,5 i pH 7 amb FC tractada per HHP i FC no tractada (control) en pols.	150
Figura 4.22: Capacitat de retenció d'aigua (% d'aigua retinguda) a pH 4,5 i pH 7 de les pastes obtingudes amb FC tractada per HHP i FC no tractada (control) deshidratades per atomització.	151
 Capítol 5: Obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats a partir de la fracció cel·lular	
Figura 5.1: Muntatge utilitzat per dur a terme les reaccions d'hidròlisi enzimàtica de la FC.	165
Figura 5.2: Esquema del procediment experimental dut a terme per determinar els efectes de l'aplicació del tractament HHP (400 MPa, 20°C, 15 min) sobre l'obtenció d'hidrolitzats descolorats d'Hb a partir de la FC.	170

Figura 5.3: Diagrama de flux del procés d'obtenció dels hidrolitzats trípsics i pèpsics d'hemoglobina deshidratats per atomització.	174
Figura 5.4: Sobrenedant recuperat (%) després de la centrifugació dels hidrolitzats obtinguts mitjançant Tripsina (T), Tripsina i Pepsina (T+P), i Alcalasa (A) a partir de FC sotmesa a altes pressions abans (HP+E) i després (E+HP) de l'addició dels enzims.	181
Figura 5.5: Grau d'hidròlisi (%) de la FC no tractada (control) i dels hidrolitzats de FC sotmesa al tractament HHP abans (HP+E) i després (E+HP) de l'addició dels enzims.	182
Figura 5.6: Percentatge de NNP de la FC no tractada (control) i dels hidrolitzats de FC sotmesa al tractament HHP abans (HP+E) i després (E+HP) de l'addició dels enzims.	182
Figura 5.7: Gels SDS-PAGE dels hidrolitzats proteics d'hemoglobina.	184
Figura 5.8: Percentatge d'humitat (%) dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització en funció de la temperatura.	187
Figura 5.9: Solubilitat proteica (%) a pH 5 de l'hidrolitzat T+P d'Hb líquid (control) i dels hidrolitzats en pols en funció de la temperatura de deshidratació.	188
Figura 5.10: Mostres de FC no hidrolitzada (control) i de l'hidrolitzat proteic d'Hb mitjançant Tripsina+Pepsina deshidratats per atomització.	190
Figura 5.11: Recòmptes totals de la FC hemolitzada (control) i de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb abans i després de la deshidratació.	191
Figura 5.12: Solubilitat proteica a pH 5 i pH 7 de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb en estat líquid i deshidratat.	193
Figura 5.13: Capacitat escumant (mL d'escuma) a pH 5 i 7 de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb en pols.	195
Figura 5.14: Estabilitat de l'escuma (%) a pH 5 i 7 de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb en pols.	196
Figura 5.15: Activitat emulsionant a t=0 i t=10 min (absorbància a 500 nm) a pH 5 i 7, de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb en pols.	197

Llistat de Taules

Capítol 1: Introducció

Taula 1.1: Subproductes d'origen animal i possibles aplicacions.	4
Taula 1.2: Composició de les fraccions de la sang.	6
Taula 1.3: Aplicacions de la sang.	7
Taula 1.4: Propietats funcionals de les proteïnes de les fraccions la sang.	11
Taula 1.5: Composició química de la fracció cel·lular de la sang de porc.	12
Taula 1.6: Composició en aminoàcids essencials de l'hemoglobina i la globina, obtinguda per diferents mètodes.	15

Capítol 2: Conservació de la fracció cel·lular mitjançant la deshidratació per atomització i caracterització del producte en pols

Taula 2.1: Activitats de l'aigua i humitats relatives en l'equilibri a 20°C de les solucions saturades de les sals utilitzades en la determinació de l'activitat de l'aigua de la FC en pols.	39
Taula 2.2: Activitats de l'aigua i humitats relatives en l'equilibri a 20°C de les solucions saturades de les sals utilitzades per determinar les isoterms de sorció de la FC en pols.	40
Taula 2.3: Propietats tèrmiques de la FC fresca, de la FC en pols en funció de la temperatura de deshidratació per atomització i d'un patró d'Hb de sang de porc obtingudes per DSC.	51
Taula 2.4: Composició química de la fracció cel·lular en pols.	61
Taula 2.5: Valors dels components CIE $L^*a^*b^*$ del color i la Saturació (C^*) de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C.	63
Taula 2.6: Valors d'activitat de l'aigua segons els aliments.	65
Taula 2.7: Efecte de l' a_w sobre el creixement i la producció de toxines de diferents espècies de microorganismes patògens en aliments.	66
Taula 2.8: Activitats de l'aigua (a_w) a 20°C de les mostres A, B i C de FC deshidratada per atomització a 140°C determinades pel mètode de la interpolació gràfica, i coeficients de regressió de les rectes.	71
Taula 2.9: Contingut en humitat en l'equilibri de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C en funció de l' a_w a 20°C.	71
Taula 2.10: Coeficients de regressió i equació polinòmica de segon grau obtinguts a partir de la representació de l' a_w/m en funció de l' a_w ; les constants i l'equació del model GAB.	75

Capítol 4: Higienització de la fracció cel·lular mitjançant el tractament amb altes pressions hidrostàtiques

- Taula 4.1:** Percentatges d'humitat (g d'aigua per 100 g de pols) de les 5 mostres de FC no tractades (control) i pressuritzades deshidratades per atomització a 140°C, i temperatures de sortida de l'aire durant la deshidratació. 116
- Taula 4.2:** Velocitat de creixement i temps de generació de la microbiota contaminant de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la població bacteriana supervivent en la FC sotmesa a 400 MPa en funció de la temperatura (5, 20 i 40°C) i el temps (5 i 15 minuts) de tractament. 129
- Taula 4.3:** Paràmetres CIE L*a*b* del color de la FC hemolitzada no tractada (control) i de les mostres de FC sotmeses a 400 MPa en funció de la temperatura (5, 20 i 40°C) i el temps (5 i 15 minuts) de tractament. 131
- Taula 4.4:** Valors dels paràmetres CIE L*a*b* del color de la FC no tractada (control) i la FC tractada per HHP deshidratades per atomització. 140
- Taula 4.5:** Percentatge d'escuma (%) als 60, 90 i 120 min de repòs, obtinguda a partir de FC tractada per HHP i FC no tractada (control) deshidratades per atomització, en funció del pH. 144

Capítol 5: Obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats a partir de la fracció cel·lular

- Taula 5.1:** Enzims proteolítics utilitzats en l'obtenció d'hidrolitzats proteics de l'hemoglobina i condicions òptimes de reacció. 163
- Taula 5.2:** Condicions de reacció dels tractaments d'obtenció d'hidrolitzats mitjançant Tripsina (T), Tripsina i Pepsina (T+P), i Alcalasa (A) a partir de FC sotmesa al tractament HHP abans i després de l'addició dels enzims. 170
- Taula 5.3:** Percentatge de sobrenedant després de la centrifugació, grau d'hidròlisi, nitrogen no proteic i grau de descoloració als sobrenedants de les solucions d'hidrolitzats d'Hb obtinguts mitjançant diferents enzims proteolítics i condicions d'hidròlisi. 177
- Taula 5.4:** Pes molecular estimat i percentatge de cada banda dels diferents pèptids que componen els hidrolitzats proteics d'Hb obtinguts mitjançant hidròlisi amb Tripsina (T), Tripsina seguit de Pepsina (T+P), i Alcalasa (A) a partir de FC sotmesa al tractament HHP abans i després de l'addició dels enzims i de la FC no hidrolitzada (control). 185
- Taula 5.5:** Característiques de les espècies produïdes en la hidròlisi enzimàtica de proteïnes. 186
- Taula 5.6:** Valors dels paràmetres CIE L*a*b* del color dels hidrolitzats trípsics i pèpsics d'Hb deshidratats per atomització en funció de la temperatura. 189
- Taula 5.7:** Composició química dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització. 189
- Taula 5.8:** Valors dels paràmetres CIE L*, a* i b* del color de l'hidrolitzat trípsic i pèptic d'Hb deshidratat per atomització. Es mostren els paràmetres del color de la fracció cel·lular no tractada (control) en pols. 191

Capítol 1: Introducció

1.1 Els subproductes de la indústria càrnia

En qualsevol procés tecnològic de conservació i/o transformació dels aliments, a part del producte principal, s'obtenen una sèrie de productes secundaris: els subproductes i residus, que en alguns casos poden tenir un interès industrial. Els subproductes són tots aquells productes amb un valor econòmic potencial, excloent la canal i les despulles, derivats del sacrifici de l'animal (Boorem i Weis, 1988). En canvi, es consideren com a residus, els productes que resten després del procés industrial que per la seva naturalesa o per aspectes econòmics no es solen aprofitar. De manera que, per exemple, la sang obtinguda per un escorxador durant el sacrifici s'ha de considerar un subproducte, mentre que el pèl del porcí generat en un escorxador és un residu (Collado, 1995). A les indústries alimentàries, especialment a les del sector carni, es generen grans volums de subproductes i residus, els quals augmenten tant les despeses econòmiques derivades del seu tractament i eliminació, com les ambientals, ja que en la majoria dels casos es tracta de productes amb un elevat contingut en matèria orgànica que cal sotmetre a varis tractaments físico-químics de depuració abans del seu abocament.

El primer objectiu de la indústria càrnia és l'obtenció de la canal a partir de l'animal viu a l'escorxador. Després, a les sales de desfer i a les indústries elaboradores, es produiran les successives transformacions per obtenir la carn fresca i un ampli ventall de productes carnis derivats (frescos, cuits, curats, fermentats, etc.). Aquestes indústries generen grans quantitats de subproductes i/o residus (Taula 1.1), amb unes característiques físico-químiques molt diverses que, en alguns casos, poden superar fins i tot el 50 % del pes inicial (Ockerman i Hansen, 1994).

És molt interessant trobar estratègies que permetin l'aprofitament i revaloració dels subproductes d'origen animal. En cas contrari, es perd un gran potencial alimentari i, a més, la indústria càrnia té la responsabilitat d'evitar i disminuir la contaminació. Cal doncs aprofitar de manera racionalitzada el recurs natural que constitueixen els animals d'abast, així com els subproductes que es generen de la seva transformació industrial.

Molts dels subproductes són una font molt important de vitamines i minerals i presenten una composició en aminoàcids semblant a la de la carn. Però existeixen altres productes que competeixen amb els subproductes carnis, com les proteïnes de la llet i de la soja, cereals i midons, que sovint tenen menor cost, millors propietats funcionals, i major estabilitat i acceptabilitat per part dels consumidors (Goldstrand, 1988). Els principals factors que influeixen la utilització dels subproductes són el seu valor nutritiu, requeriments sanitaris, que siguin competitius al mercat des del punt de vista econòmic i

la seva acceptació per part del consumidor. Pels consumidors, la utilització dels subproductes carnis als aliments està relacionada negativament amb la percepció de qualitat. A més, la seva acceptabilitat està determinada per factors molt complexes com els costums, la cultura i la religió.

Taula 1.1: Subproductes d'origen animal i possibles aplicacions.

-
1. Menuts o despulles (subproductes comestibles que inclouen òrgans) per a consum humà.
 2. Greixos comestibles per a la fabricació de margarines, productes de pastisseria, dolços i xiclets.
 3. Ossos provinents de desossat mecànic per fabricar sopes, botons, mànecs de ganivets, farines d'ossos, diferents varietats de ceràmica o utilitzats en el refinat del sucre.
 4. Sang per a consum humà o per fabricar farines de sang, adhesius o fertilitzants.
 5. Renina per a la fabricació de formatges.
 6. Intestins per tripes d'embotits, cordes d'instruments musicals, material de sutures quirúrgiques.
 7. Gelatina per a productes de pastisseria, rebosteria i gelateria.
 8. Substàncies terapèutiques: hormones, albúmina, bilirrubina, epinefrina, insulina, extractes hepàtics, pepsina, testosterona, tromboplastina, timocrescina i tiroxina.
 9. Pinsos compostos (generalment molt rics en proteïnes i substàncies minerals) per a ramaderia, gossos, gats i aqüicultura.
 10. Pells i cuirs. Pèls per a brotxes, catifes, aïllaments i equipaments esportius. Plomes per a aïllaments, coixins, articles esportius i pinsos per a animals.
 11. Llana i extractes de lanolina.
 12. Greixos no comestibles de múltiples usos industrials (fabricació de pneumàtics, lubricants, insecticides i germicides).
 13. Fertilitzants i adobs.
-

Font: American Meat Institute, 1958; Levie, 1976; citat per Ockerman i Hansen (1994).

Ockerman i Hansen (1994) descriuen varis requeriments que han de complir els subproductes d'origen animal per poder utilitzar-los: (1) existència d'un procés comercial pràctic per poder convertir el subproducte animal en un article aprofitable per a la indústria; (2) obtenció del subproducte en quantitat suficient en un lloc determinat, de manera que el seu processament sigui econòmic; (3) existència d'un mercat potencial o real pel producte final; (4) existència d'algun procediment tecnològic de conservació adequat que permeti l'emmagatzematge del subproducte abans i després de processar-lo; i (5) existència d'operaris especialitzats per treballar en aquest tipus d'indústries. Tanmateix, la dificultat d'assolir aquests requeriments fa que en molts casos la transformació i reutilització d'alguns subproductes no sigui del tot viable.

1.2 La sang de porc

La sang és el medi intern de l'organisme encarregat del transport d'oxigen i nutrients cap als diferents teixits i cèl·lules, i de l'eliminació dels metabolits, i representa al voltant del 3,5 % dels animals vius. Conté substàncies amb activitat biològica que poden contribuir en la neutralització d'agents tòxics, altres de funció immunològica, així com enzims i hormones. La sang està composta principalment per aigua i proteïna. Està formada per una substància intercel·lular, el plasma, i per diferents tipus de cèl·lules en suspensió que formen la fracció cel·lular.

De la sang sencera es poden obtenir diferents fraccions en funció de si se li addicionen substàncies anticoagulants o no (Figura 1.1). El procés de fraccionament de la sang, per separar el plasma de la fracció cel·lular, consisteix en centrifugar la sang sencera, a la qual, prèviament, se li ha addicionat algun agent anticoagulant, essent els més freqüents l'àcid cítric o el citrat sòdic i els polifosfats. Tanmateix, en absència d'anticoagulants, a partir de la sang coagulada, es pot obtenir el sèrum, que és l'equivalent al plasma, però sense la presència del fibrinogen i de precursors dels factors de la coagulació.

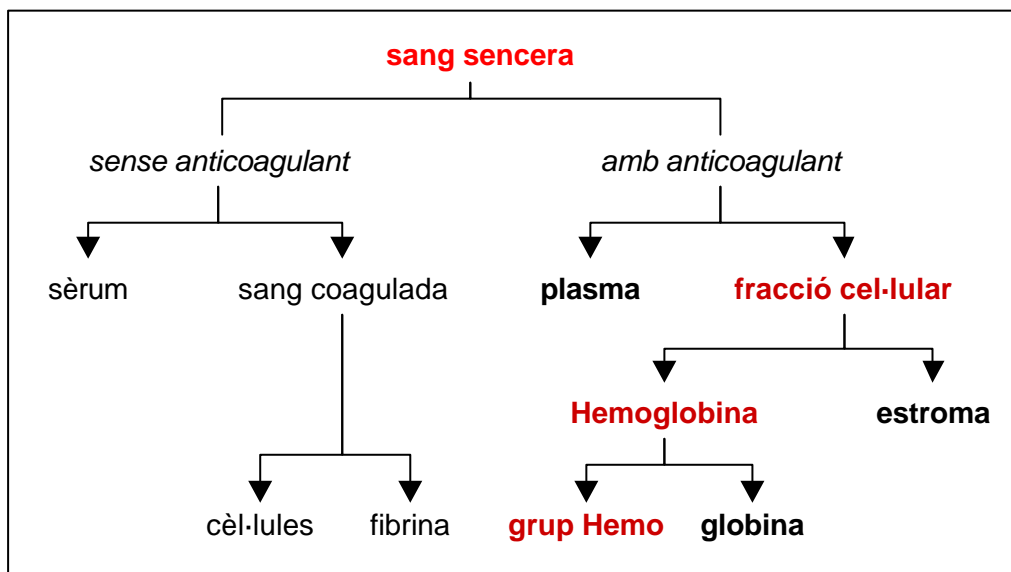


Figura 1.1: Diferents fraccions de la sang (Ranken, 1980).

La sang és una de les fonts de proteïna més valuosa i infrautilitzada que genera la indústria càrnia (Ledward i Lawrie, 1984). A la Taula 1.2 es presenta la composició de la sang i de les seves fraccions. El plasma sanguini, que representa aproximadament entre el 55 i el 65 % de la sang, està compost principalment per aigua (entre un 90 i un 91 %); la resta es correspon majoritàriament a les proteïnes plasmàtiques: globulines, albúmines i fibrinogen. La fracció cel·lular (entre el 35 i el 45 % de la sang) té un contingut en humitat del 65 % i l'hemoglobina representa el 90-91 % del seu extracte sec total (35 %);

la resta de la proteïna i els lípids formen part de l'estroma dels eritròcits. També cal considerar el contingut en ferro del grup hemo de l'hemoglobina.

Taula 1.2: Composició de les fraccions de la sang (en g·100 g⁻¹).

Component	Sang sencera	Sèrum (66% de la sang)	Plasma (60% de la sang)	Fracció cel·lular (40% de la sang)
Aigua	80,8	91,2	90,8	60,8
Sals minerals	0,9	0,8	0,8	1,1
Greixos	0,2	0,1	0,1	0,4
Proteïnes:	17,0	7,5	7,9	35,1
Albúmina	2,2	3,3	3,3	-
Fibrinogen	0,3	-	0,4	-
Globulina	2,8	4,2	4,2	-
Estroma	1,7	-	-	5,1
Hemoglobina	10,0	-	-	30,0
Altres substàncies	1,1	0,4	0,4	2,6

Font: Ranken (1980).

1.3 Revaloració i aprofitament de la sang

Quan els animals d'abast es transformen en la canal a l'escorxador, es generen grans quantitats de sang. Segons la FAO, l'any 2001 es van sacrificar aproximadament uns 36 milions de caps de porcí a l'Estat Espanyol; suposant que el volum de sang que es recull és d'uns 2,5-3 L per porc, es van produir unes 97.000 tones de sang de porc. La sang és un dels subproductes amb més poder contaminant, amb una DBO₅ de 250.000 mg·L⁻¹ i una DQO de 375.000 mg·L⁻¹ (Tritt i Schuchardt, 1992) i, per tal de reduir la càrrega orgànica en els efluent dels escorxadors industrials, és essencial recuperar-la. A la Taula 1.3 es citen les possibles aplicacions o vies d'aprofitament de la sang en diferents sectors industrials, per exemple: com additiu en productes alimentaris, alimentació animal, laboratoris, usos mèdics i farmacològics, com a primera matèria en algunes indústries i com a fertilitzant.

Fins fa poc, la major part de la sang produïda als escorxadors de l'Estat espanyol s'ha estat utilitzant com a suplement proteic en la fabricació de pinsos compostos en forma de farines de sang. Tanmateix, des de l'any 2000, arran dels problemes sanitaris d'encefalopatia espongiforme bovina (EEB o BSE), han aparegut noves reglamentacions sanitàries pels pinsos que contenen proteïnes d'origen animal. L'Ordre APA/1556/2002,

del 21 de juny (BOE número 151, del 25 de juny de 2002), estableix el sistema de control per assegurar la correcta eliminació i la traçabilitat de la destinació dels subproductes generats a la indústria càrnia, com a mesura de protecció contra les encefalopaties espongiformes. Com a conseqüència, actualment, i fins que no aparegui una nova reglamentació menys restrictiva, existeix una prohibició temporal de l'ús de proteïnes animals elaborades al territori de la Unió Europea per a l'alimentació d'animals de producció; els subproductes i les despulles generats en la cadena alimentària càrnia s'han de tractar com a residus especials, s'han de retirar i sotmetre a tractaments de destrucció, i els materials especificats de risc (MER) s'han d'excloure de la cadena alimentària. En aquest context, sembla que algunes de les possibles aplicacions de la sang estan actualment limitades, però hem de considerar que la sang està considerada com un producte de baix risc, com la llet i la carn. Per tant, està totalment justificat el fet de trobar alternatives viables que permetin la seva revaloració, sempre i quan es puguin obtenir productes finals amb bones característiques higienico-sanitàries.

Taula 1.3: Aplicacions de la sang.

Aliments	Agent emulsionant, estabilitzant, gelificant, clarificant, colorant, component nutricional, substitut de la clara d'ou.
Pinsos compostos	Suplement de lisina, estabilitzador de vitamines, substitut de la llet, component nutricional.
Fertilitzants	Revestiment de llavors, estabilitzant del pH del sòl, components minerals.
Laboratoris	Medis de cultiu, peptones, albúmines, globulines, esfingomielina, catalasa.
Medicina	Proves bioquímiques d'aglutinació, immunoglobulines, tècniques de fraccionament, factors de coagulació, material de sutures quirúrgiques, fibrinogen, derivats de fibrina, serotonina, plasminogen, additius del plasma.
Altres sectors	Adhesius, finalitzadors pel cuir i teixits, coadjuvants d'insecticides, extintors per a incendis, fabricació de ceràmica i plàstics, formulacions base de plàstics i cosmètics.

Font : De Divakaran (1980; citat per Ockerman i Hansen, 1994).

Des de l'any 1982 existeix una empresa (APC Europe) a la comarca del Vallès Oriental que gestiona la recollida, tractament i aprofitament de la sang procedent d'escorxadors de Catalunya i d'alguns de l'Estat espanyol. Han desenvolupat l'obtenció i comercialització de varis productes a partir de la sang que tenen aplicacions en el sector alimentari, cosmètic, farmacològic, dietètic i agrícola.

El principal problema que comporta la utilització de la sang per a l'alimentació humana és l'elevada contaminació microbiològica que aquesta presenta. La sang a l'interior dels

animals sans és estèril, però durant el procés de sacrifici i dessagnat es sol barrejar amb l'aigua de rentat que regalima per l'animal i amb la brutícia de l'exterior de la pell pròxima a la zona del tall de dessagnat. Aquest fet provoca un augment considerable de la càrrega microbiològica, arribant a una contaminació de l'ordre de 10^6 ufc·mL⁻¹ de microorganismes aerobis mesòfils viables (Gill, 1988; Parés, 1995), i condiciona negativament la seva possible utilització com a primera matèria de la indústria alimentària.

1.3.1 Sistemes de recollida de la sang a l'escorxador

Un dels principals factors que influencien el grau de contaminació microbiològica de la sang obtinguda a l'escorxador és el sistema de recollida utilitzat. En funció del procediment utilitzat es poden diferenciar dos tipus de sang de diferent qualitat: la sang veterinària i la sang higiènica (Rodríguez, 1994).

1.3.1.1 Sang veterinària

És la sang obtinguda mitjançant el dessagnat normal amb ganivet, recollida en banyeres on es sol barrejar amb substàncies estranyes (orins, aigües de rentat, excrements, etc.) que presenten una elevada càrrega microbiològica contaminant i, per tant, fa que aquesta no es pugui utilitzar com a primera matèria per a l'alimentació humana. La sang recollida per aquest mètode (sistema obert), també anomenada sang zootècnica, és la que fins a l'aparició de les restriccions per a l'ús dels subproductes d'origen animal s'havia estat destinant a l'elaboració de pinsos compostos per a l'alimentació animal en forma de farines de sang, però ara és recollida per empreses autoritzades per a la seva destrucció.

1.3.1.2 Sang higiènica

És la sang recollida directament del flux sanguini de l'animal, amb la qual es pot obtenir una sang neta, exempta de qualsevol altre producte i amb una càrrega microbiològica molt baixa, teòricament de l'ordre de 10 ufc·mL⁻¹ (Gill, 1988), però a la pràctica tampoc és així. D'aquesta manera s'aconsegueix un producte amb un valor afegit superior. Aquest tipus de recollida es fa amb un ganivet tubular de fulla balmada o trocar, del qual surt un tub que va directament, o passant per un bescanviador de calor, cap a un dipòsit refrigerat (Figura 1.2). Addicionalment, aquest ganivet pot estar provist d'un dispositiu que permet afegir l'anticoagulant durant el procés de recollida de forma simultània (Wismer-Pedersen, 1988).

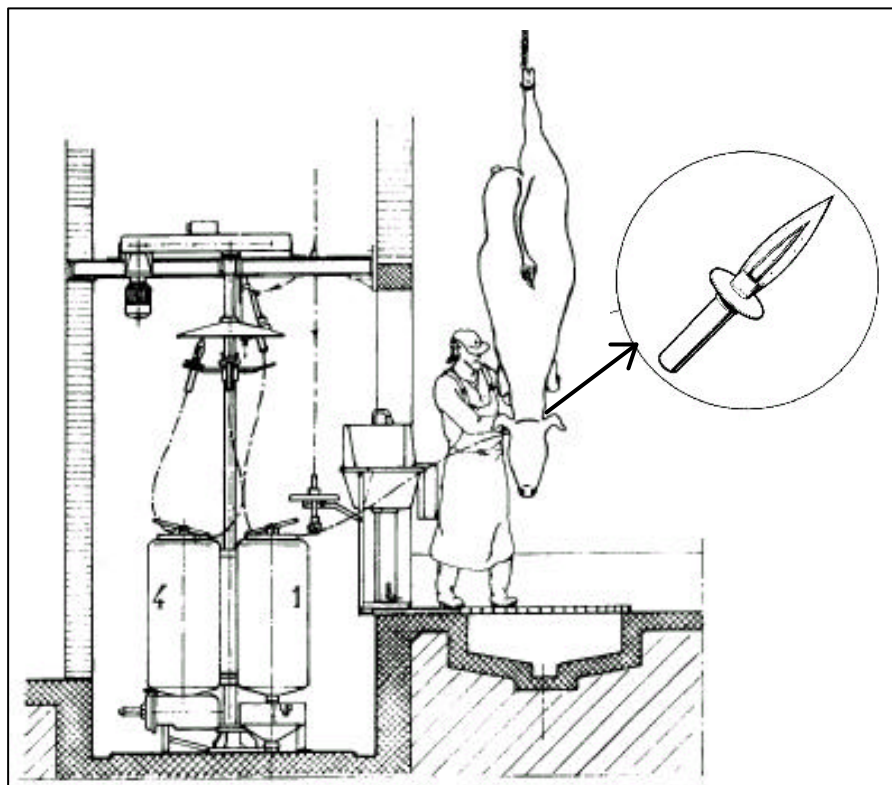


Figura 1.2: Sistema de recollida higiènica de la sang d'escorxador (Wismer-Pedersen, 1988) i detall del ganivet utilitzat (Ockerman i Hansen, 1994).

Tot i que el producte final recollit amb el sistema higiènic o tancat té un valor afegit molt més gran que el de la sang recollida de forma convencional pel sistema obert, i una qualitat microbiològica i unes característiques físico-químiques aptes per a la seva utilització en alimentació humana, no existeixen gaires escorxadors que utilitzin aquest mètode. Aquest sistema s'utilitza principalment en escorxadors de boví dels Estats Units. El principal problema de la utilització de ganivet balmat és que el procés de dessagnat és més lent i fa disminuir la velocitat de la línia de sacrifici, fet que provoca una disminució del rendiment del procés, especialment en el cas del porcí, on el volum de sang que es recull és molt inferior al de la línia de boví. Aquest sistema presenta altres inconvenients, com les possibles pèrdues d'algunes parts de la canal en porcí, donat que el ganivet pot malmetre l'espatlla de l'animal, i que, a la pràctica, la qualitat microbiològica obtinguda tampoc és la teòrica.

Per aquests motius, a l'estat espanyol molts escorxadors apliquen un sistema de recollida obert modificat, que consisteix en prendre una sèrie de mesures higièniques com són: desinfectar periòdicament la zona de dessagnat, addicionar immediatament l'anticoagulant, refrigerar ràpidament la sang i emmagatzemar-la en condicions de refrigeració fins al moment de la recollida.

1.3.2 Valor nutritiu de la sang

La sang és un producte amb un valor nutricional semblant al de la carn magra, amb un elevat contingut en proteïnes, al voltant del 15 % que, a més, tenen un valor biològic considerable. El valor biològic (BV) d'una proteïna és un paràmetre que permet avaluar la qualitat de les proteïnes alimentàries, i es defineix com la fracció de nitrogen retingut en l'organisme pe al creixement i el manteniment de la síntesi cel·lular (Robinson, 1991). Les proteïnes de la sang presenten tots els aminoàcids essencials per a la nutrició humana (Tybor *et al.*, 1975). Un aminoàcid o qualsevol altre component de la dieta és essencial per a l'home i els animals, en primer lloc, quan aquests no el poden sintetitzar i, en segon lloc, quan és necessari com a component de la dieta, per si mateix o per un dels seus derivats metabòlics, per dur a terme les funcions metabòliques i el creixement normal.

La sang sencera és una font important de ferro i de lisina. Conté aproximadament uns 30 mg·100 g⁻¹ de ferro, mentre que la carn de vedella o la de porc en presenten 2,6 i 1,6 mg·100 g⁻¹, respectivament (Gorbatov, 1988). L'alt contingut en lisina fa que la sang o les seves proteïnes siguin un excel·lent complement per augmentar el valor biològic dels productes fabricats a partir dels cereals, els quals són deficitaris en aquest aminoàcid (Young *et al.*, 1973; citat per Satterlee, 1975). L'addició de tan sols un 2 % de proteïnes del plasma en pols al pa, augmenta un 15 % el seu contingut en proteïna i aproximadament un 75 % de lisina en relació a les quantitats d'aquests compostos abans de l'addició (Ockerman i Hansen, 1994). Cal destacar, però, que la sang és deficient en els aminoàcids essencials isoleucina i metionina (presentes en elevada quantitat a les carns vermelles), fet que no ha de suposar una limitació, doncs aquesta sang normalment s'afegirà a altres productes alimentaris com a suplement proteic o per la seva funcionalitat.

1.3.3 Propietats funcionals de la sang

Les propietats funcionals dels components dels aliments són totes aquelles propietats no nutricionals que influencien la utilització d'un ingredient en un producte alimentari. La major part de les propietats funcionals tenen influència sobre les característiques organolèptiques de l'aliment, especialment la textura, però també determinen el comportament físic dels aliments o dels ingredients durant el processat, emmagatzematge i preparació i, per tant, afecten a la qualitat i l'acceptabilitat dels aliments (Pomeranz, 1991). Les propietats funcionals de les proteïnes són propietats físico-químiques, dependents de l'estructura primària, secundària, terciària i quaternària, i es poden classificar en tres grans grups: les propietats d'hidratació (interaccions proteïna-aigua), com l'absorció, capacitat de retenció d'aigua, inflament, dispersabilitat, solubilitat i viscositat; les propietats dependents de les interaccions proteïna-proteïna, com la precipitació i la gelificació; i les propietats de superfície, entre les quals cal destacar les

capacitats escumant i emulsionant (Cheftel *et al.*, 1989). A la Taula 1.4 es poden veure les principals propietats funcionals de les proteïnes de la sang. Aquestes propietats funcionals determinaran les possibles aplicacions de les proteïnes de la sang. El plasma es pot utilitzar en productes que consisteixen en, o contenen, elements en un sistema gelificat per la calor (com per exemple salsitxes); per contra, la globina, que presenta una molt bona capacitat d'inflament amb l'aigua, es pot utilitzar en sistemes fluids i viscosos que han de romandre fluids després de l'escalfament o per les seves propietats escumants i emulsionants (Ranken, 1980).

Taula 1.4: Propietats funcionals de les proteïnes de les fraccions la sang.

Propietat funcional	Proteïnes del Plasma	Globina
Solubilitat	bona	bona a pH inferior a 6
Inflament amb aigua	pobre	molt bona
Viscositat	baixa	mitjana (alta després de l'escalfament)
Capacitat emulsionant	mitjana	bona
Estabilitat de l'emulsió	bona (menor en presència de sal)	bona a pH inferior a 6 (millor en presència de sal)
Capacitat escumant	bona	molt bona
Formació de gels	molt bona a $T^a \geq 70^{\circ}\text{C}$, la força del gel incrementa amb l'addició de sal	no forma gels, forma una crema o pasta espessa

Font : Ranken (1980).

1.4 Fracció plasmàtica

La fracció plasmàtica de la sang és un líquid amb un 7-8 % de proteïnes d'alt valor nutritiu: albúmines, globulines i fibrinogen. A diferència d'altres fonts de proteïna d'origen animal, el plasma pràcticament no conté colesterol i proporciona un elevat contingut en proteïna càrnia als derivats als quals s'incorpora. Pel que fa a les seves propietats funcionals, cal destacar la capacitat de formar gels per escalfament, la formació d'escuma i una excel·lent capacitat emulsionant. Les propietats gelificants del plasma són semblants a les de la clara de l'ou, fet que el converteix en un possible additiu per millorar la textura i el rendiment de productes carnis, postres i productes de pastisseria i rebosteria. La seroalbúmina i la seroglobulina també són bons agents emulsionants. Si es compara la capacitat emulsionant del plasma amb altres additius, és inferior a la de la

caseïna, però superior a la de la farina de soja i a la de les proteïnes càrnies (Ockerman i Hansen, 1994). S'ha proposat la utilització del plasma com a substitut de la clara de l'ou en productes de pastisseria, donat que les proteïnes plasmàtiques presenten una capacitat escumant comparable a la de l'albumina d'ou, malgrat que l'estabilitat de l'escuma obtinguda sigui inferior (Parés, 1998).

1.5 Fracció cel·lular

A la Taula 1.5 es pot observar la composició química de la fracció cel·lular de la sang de porc. La fracció cel·lular o corpuscular de la sang està composta principalment pels eritròcits o cèl·lules vermelles (Figura 1.3), que tenen una forma de disc bicòncav i que són els responsables del transport dels gasos (oxigen i diòxid de carboni) i, en menor proporció, pels leucòcits (cèl·lules blanques) i els trombòcits (plaquetes) que intervenen en els fenòmens de la coagulació.

Taula 1.5: Composició química de la fracció cel·lular de la sang de porc.

Components	(g·100g ⁻¹ de sang de porc)
Aigua	62,56
Sòlids totals	37,44
Hemoglobina	32,68
Altres proteïnes	1,92
Sucre	--
Colesterol	0,049
Lecitina	0,346
Greix	--
Àcids grassos	0,006
Fòsfor als àcids nucleics	0,010
Sodi	--
Potassi	0,496
Òxid fèrric	0,159
Calci	--
Magnesi	0,015
Clor	0,147
Fòsfor total	0,206
Fòsfor inorgànic	0,165

Font: Adaptat de Gorbatov (1988).

Els eritròcits contenen majoritàriament l'hemoglobina (Hb), que és la proteïna més abundant de la sang, ja que representa entre un 60 i 70 % de la proteïna total de la sang sencera (del 11 al 17 %) i pràcticament la totalitat (quasi el 90 %) del contingut en

proteïna que conté la fracció cel·lular (del 35 al 38 %). La fracció cel·lular es pot sotmetre a un tractament d'hemòlisi per trencar els eritròcits i, d'aquesta manera, es pot recuperar l'Hb en forma de concentrat i, per centrifugació, es pot separar l'estroma (paret cel·lular), que consisteix en una matriu semblant a una esponja composta fonamentalment per lipoproteïnes.



Figura 1.3: Fotografia SEM dels eritròcits de la fracció cel·lular de la sang (Sullivan, J.A.[®], a: <http://www.cellsalive.com>).

1.5.1 L'hemoglobina

L'hemoglobina (Hb), proteïna responsable del color vermell de la sang, és una macromolècula d'estructura complexa amb un pes molecular de 68.000 Daltons. L'Hb dels vertebrats està formada per quatre subunitats polipeptídiques: dues cadenes alfa i dues beta ($\alpha_2\beta_2$), disposades de forma esfèrica en l'espai. Cada polipèptid (globina) conté un grup prostètic, el grup hemo, una molècula macrocíclica anomenada protoporfirina que té un àtom de ferro, localitzat en una espècie de butxaca rica en residus apolars i unit a la part proteica (Figura 1.4).

El grup hemo és el pigment respiratori de la molècula i el responsable de la coloració de l'Hb, que depèn únicament i directa de l'estat d'oxidació d'aquest pigment. El grup hemo consta d'una part orgànica i un àtom de ferro. La part orgànica, la protoforfirina, està formada per quatre grups pirròlics units entre si en forma d'anell. L'àtom de ferro està lligat a 5 àtoms de nitrogen, dels quals 4 pertanyen al centre de l'anell porfirínic, i el cinquè a la histidina F8 de la globina; el sisè enllaç de coordinació queda disponible i pot fixar molècules com O_2 , CO_2 i H^+ , mentre que el ferro roman bivalent (Fe^{2+}). El ferro hemínic pot estar en estat d'oxidació ferrós (Fe^{+2}) o fèrric (Fe^{+3}) i les formes corresponents de l'Hb s'anomenen ferroHb ($Hb-Fe^{2+}$) i ferriHb ($Hb-Fe^{3+}$), respectivament (Figura 1.5). La ferriHb també s'anomena metaHb. Només la ferroHb pot captar oxigen (Stryer, 1995).

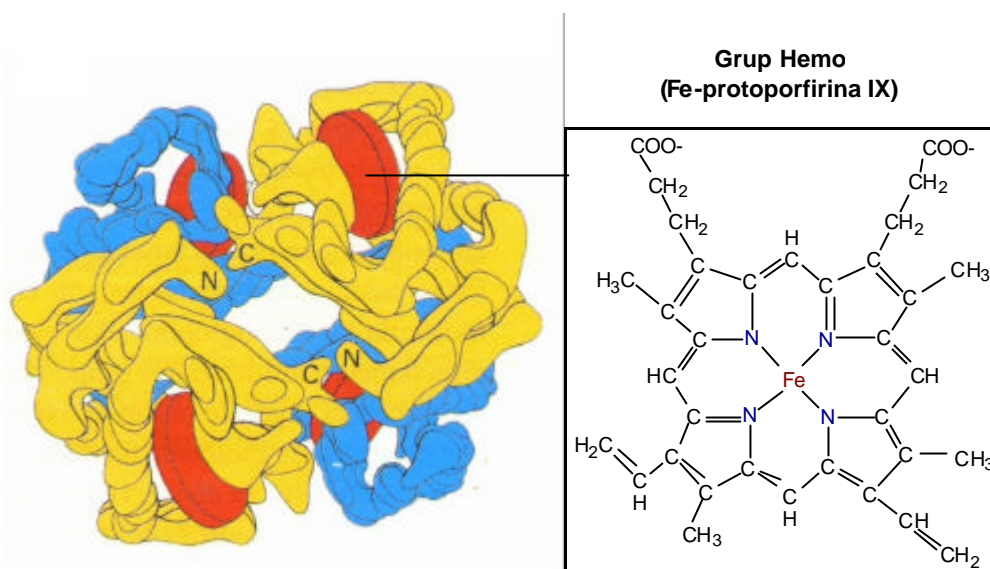


Figura 1.4: Diagrama esquemàtic de l'hemoglobina mostrant l'estructura dels grups hemo associats. Les cadenes α són grogues, les cadenes β blaves i els grups hemo vermells (Stryer, 1995).

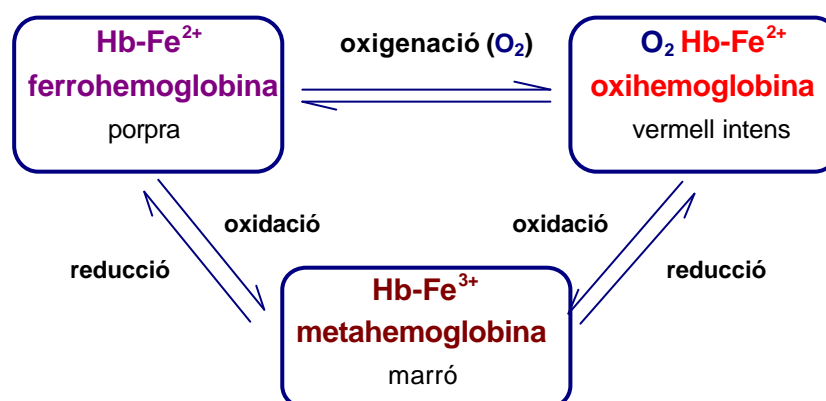


Figura 1.5: Formes de l'hemoglobina en funció de l'estat del grup hemo i de la concentració d'oxigen, mostrant el color característic de cadascuna.

La globina i el grup hemo representen el 94 i el 6 %, respectivament, de l'Hb i el grup hemo conté al voltant d'un 9 % de ferro (Ranken, 1980). És precisament el pigment hemo el que pot conferir una intensa pigmentació vermella-marronosa als productes alimentaris als quals s'addiciona l'Hb, fet que ha condicionat negativament les possibilitats d'utilitzar la fracció cel·lular a la indústria alimentària. A més, l'addició de la fracció cel·lular pot conferir al producte final un *flavour* a sang que moltes vegades resulta desagradable per als consumidors (Wismer-Pedersen, 1988). Per evitar el problema de l'enfosquiment cal aplicar una sèrie de tractaments de descoloració. En aquesta direcció, s'han desenvolupat diferents alternatives basades en el trencament de la unió entre els dos components de l'Hb i la posterior separació del grup hemo per recuperar la globina (Corcuff *et al.*, 1985).

1.5.2 Valor nutritiu de l'hemoglobina i la globina

El contingut en aminoàcids essencials de l'Hb i la globina es mostra a la Taula 1.6. Les variacions entre les diferents globines es deuen al tipus de metodologia utilitzada per al seu aïllament. Tant l'Hb com la globina són excel·lents fonts de leucina i lisina. El contingut en altres aminoàcids essencials (fenilalanina, triptòfan, treonina i valina) supera els requeriments proposats per la FAO. Però, com ja s'ha exposat anteriorment en el cas de la sang, els aminoàcids limitants són la metionina i la isoleucina. Malgrat això, com que s'utilitzarà per augmentar el valor nutritiu de productes que ja contenen proteïna, o per les seves propietats funcionals, aquesta deficiència no suposa cap inconvenient.

Taula 1.6: Composició en aminoàcids essencials de l'hemoglobina i la globina, obtinguda per diferents mètodes (g·100 g⁻¹) (Wismer-Pedersen, 1988).

Aminoàcid	Hemoglobina	Globina ^a	Globina ^b	Globina ^c	Requeriments humans (FAO)	
					Nens	Adults
Isoleucina	0,58	0,33	0,17	0,44	3,7	1,8
Leucina	13,36	11,40	13,3	13,78	5,6	2,5
Lisina	8,26	6,85	8,2	8,94	7,5	2,2
Metionina	0,92	0,76	1,4	0,76	- ^d	-
Cistina	0,73	0,61	0,5	0,64	-	-
Aminoàcids amb S totals	1,65	1,37	1,9	1,40	3,4	2,4
Fenilalanina	6,49	5,77	5,4	6,79	3,4	2,5
Tirosina	2,21	1,70	2,3	1,48	3,4	2,5
Treonina	3,15	2,43	5,4	3,00	4,4	1,3
Triptòfan	1,90	1,60	ND	0,90	0,5	0,7
Valina	8,82	6,94	8,7	10,24	4,1	1,8

^a Globina aïllada amb acetona segons Kuppevelt *et al.* (1976).

^b Globina aïllada amb carboximetilcel·lulosa (CMC) segons Sato *et al.* (1981).

^c Globina segons Wismer-Pedersen (1987).

^d no establert.

ND: no determinat.

1.5.3 Propietats funcionals de l'hemoglobina i la globina

L'Hb és una proteïna de gran solubilitat i presenta una elevada activitat emulsionant (Nakamura *et al.*, 1984) i capacitat de desenvolupar escumes estables (Wismer-Pedersen, 1988). La capacitat escumant de la globina i l'estabilitat de l'escuma és major que la del plasma (Tybor *et al.*, 1975) i relativament estable enfront les variacions de pH i la concentració de sal. Sense el grup hemo, la globina és menys resistent que l'Hb a la

calor i als agents desnaturalitzants, com els solvents orgànics o el pH àcid utilitzats en els processos de descoloració. La conseqüència més desfavorable és la dràstica disminució de la solubilitat que experimenta la globina a intervals de pH d'entre 6,5 i 9, més accentuada en presència de sal. Aquesta disminució de solubilitat també repercuteix en una menor capacitat escumant i emulsionant.

A diferència de les proteïnes del plasma, la globina no forma gels per escalfament, essent una característica molt interessant si es vol utilitzar en productes carnis; però presenta una elevada capacitat d'inflament que confereix una consistència cremosa en el producte quan una dispersió de globina al 10 % s'escalfa a 80°C. També presenta una gran capacitat de retenció d'aigua, propietat desitjada en molts productes carnis cuits. Una altra possibilitat és la utilització combinada de la globina i el plasma sanguini, ja que en presència d'un 1 % de sal formen un gel més ferm que el plasma sol a pH 5-5,4 (Wismer-Pedersen, 1988).

1.5.4 Utilització de la fracció cel·lular

Tradicionalment la FC s'ha utilitzat en molts països per a l'elaboració de productes típics com botifarres negres, morcilles o pastissos de sang, però només es destina a la producció d'aquests tipus de productes una petita proporció de l'Hb disponible, desaprofitant-ne una gran quantitat. El gran potencial de la fracció cel·lular a la indústria alimentària resideix en el seu elevat contingut en proteïna i en la seva funcionalitat.

El principal camp d'utilització de la globina són els productes carnis, però també cal considerar altres aplicacions. A causa del seu elevat contingut en lisina, es pot utilitzar per l'enriquiment de cereals com el blat i el blat de moro. La globina també es pot utilitzar combinada amb el plasma per substituir l'ou en l'elaboració de galetes i d'altres productes de pastisseria (Wismer-Pedersen, 1988). Altres aplicacions possibles es troben en el camp de l'alimentació humana, com a font de ferro i aminoàcids essencials i en la nutrició animal, on diversos autors han suggerit l'obtenció d'hidrolitzats proteics a partir de l'Hb.

També es pot utilitzar en petites quantitats per millorar el color d'alguns productes carnis. Ranken (1980) cita la conversió de l'Hb a nitrosil Hb i a carbonil Hb, compostos que es poden utilitzar per proporcionar coloració vermella en múltiples aplicacions, sobretot en embotits, donat que la nitrosil mioglobina és el pigment responsable del color dels productes carnis curats com el pernil. Aquesta possibilitat és molt interessant en aquells països en els quals no estan permesos els colorants vermells artificials.

Quant al pigment hemo, obtingut com a residu en la hidròlisi de l'Hb, ja hem descrit que es pot aprofitar com a colorant alimentari d'origen carni, però d'aquest es pot recuperar el ferro hèmic, el qual pot tenir molt bones aplicacions farmacològiques en el tractament de

l'anèmia, doncs segons Rodríguez (1994) i Wismer-Pedersen (1988) aquest s'absorbeix més fàcilment, fins i tot de dos a tres vegades més, que quan es dona en forma de sals de ferro o de ferro lliure.

1.6 Objectius generals i estructuració del treball

Els objectius generals del treball que es presenta fan referència a les diferents possibilitats de revaloració i aprofitament de la fracció cel·lular provinent de la sang de porc d'escorxadors industrials. El treball s'ha estructurat en 4 capítols que tenen diversos objectius concrets.

El Capítol 2 està basat en l'aplicació del procés de deshidratació per atomització com a una tecnologia viable per conservar la fracció cel·lular. Els objectius concrets d'aquesta part del treball són, en primer lloc, determinar les condicions òptimes d'aplicació del procés de deshidratació a la fracció cel·lular; en segon lloc, caracteritzar el producte en pols obtingut des del punt de vista físico-químic i microbiològic, i, finalment, determinar l'activitat de l'aigua (a_w) i les isoterms de sorció de la fracció cel·lular deshidratada per tenir informació sobre les possibilitats de conservació del producte durant el període d'emmagatzematge.

Al Capítol 3 s'estudiaran les possibilitats d'evitar l'enfosquiment oxidatiu que pateix la fracció cel·lular durant la deshidratació per atomització en el cas que aquesta es vulgui utilitzar com a un agent colorant d'origen natural i alhora com a ingredient nutricional i/o funcional en productes alimentaris, ja sigui com a una font important de proteïna amb bones propietats funcionals i/o un suplement de ferro orgànic. S'estudiarà si l'addició de diferents substàncies antioxidants i/o segrestants del ferro tenen un efecte protector i estabilitzant del color de l'hemoglobina durant la seva deshidratació i el posterior emmagatzematge.

Els objectius del Capítol 4 són estudiar la viabilitat de l'aplicació de les altes pressions hidrostàtiques com a una tecnologia no tèrmica per higienitzar la fracció cel·lular prèviament al procés d'assecamment i així disminuir l'elevada contaminació microbiològica que aquesta presenta. Es determinaran les millors condicions d'aplicació del tractament amb altes pressions a la fracció cel·lular, basant-nos en els seus efectes sobre la microbiota contaminant i sobre algunes característiques funcionals. Un cop fixades les millors condicions de pressurització, s'estudiaran les diferents propietats funcionals de la fracció cel·lular tractada per alta pressió hidrostàtica i deshidratada per atomització.

Els objectius del Capítol 5 són l'obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats a partir de la fracció cel·lular, amb la finalitat que es pugui addicionar a productes alimentaris com a

ingredient nutricional i/o funcional, sense que proporcioni coloració vermella-marronosa o fosca als productes als quals s'incorpori. S'assajaran diferents enzims proteolítics i s'avaluarà la seva eficàcia en l'obtenció d'hidrolitzats descolorats. També s'estudiaran els efectes de l'aplicació del tractament amb altes pressions hidrostàtiques sobre el procés d'obtenció d'hidrolitzats proteics de la FC. Finalment, es determinaran les condicions de deshidratació per atomització de l'hidrolitzat descolorat d'Hb i les característiques físico-químiques, microbiològiques i les propietats funcionals dels hidrolitzats proteics d'Hb deshidratats per atomització.

Capítol 2: Conservació de la fracció cel·lular mitjançant la deshidratació per atomització i caracterització del producte en pols.

2.1 INTRODUCCIÓ

El mètode de conservació d'elecció per aplicar a un determinat producte serà aquell procediment que sigui viable tant econòmicament com tècnica, és a dir, dependrà del tipus de producte a conservar, de la seva naturalesa i del valor afegit que se'n derivarà després del seu processament industrial. La sang, i en especial la fracció cel·lular, és un medi idoni per al desenvolupament dels microorganismes ja que té una composició molt diversa i una activitat de l'aigua elevada. Per tant, és important escollir un procés tecnològic de conservació segur des del punt de vista higiènic i sanitari; que garanteixi la seva qualitat (nutritiva, organolèptica i funcional) durant el període d'emmagatzematge, distribució i transport; i econòmic, doncs es tracta d'un subproducte.

Martín Yero *et al.* (1995) fan una revisió dels mètodes de conservació més utilitzats en el tractament de la sang. Els processos que s'apliquen a la sang destinada a l'alimentació animal (sang veterinària) es solen basar en la utilització de conservadors químics, com el bisulfit sòdic, amoníac, àcids clorhídric, fosfòric i sulfúric, o la combinació d'alguns d'aquests. Per a la sang destinada al consum humà (sang higiènica) i/o les seves fraccions, els processos més utilitzats són la refrigeració i la congelació, encara que la deshidratació ocupa un lloc destacat per diversos motius que s'exposaran més endavant. La congelació del plasma es sol fer amb un bescanviador de rodets o de tambors. La superfície dels cilindres està entre -10 i -40 °C i, després de la congelació, la superfície es rasca amb unes ganivetes i s'obtenen una espècie de flocs. El plasma també es pot congelar amb congeladors de plaques, amb els quals s'obtenen unes peces en forma de blocs. També s'ha suggerit l'addició d'àcid làctic per coagular i conservar la sang, la utilització d'agents antimicrobians com l'àcid sòrbic i el propiònic (Ockerman i Hansen, 1994) i l'addició de bacteris de l'àcid làctic com a cultius bioprotectors per a la conservació de la sang (Morgan, 1985; Pinel, 1985). Al nostre grup s'està portant a terme una altra línia de recerca que té com a objectiu principal desenvolupar un sistema de bioconservació de la sang d'escorxadors industrials amb bacteris làctics (Zamora, 2000).

De totes maneres, el sistema més utilitzat per conservar les fraccions de la sang durant períodes llargs de temps és la deshidratació. El plasma, a causa del seu elevat contingut en aigua (90 %), es sol concentrar prèviament a la deshidratació per raons econòmiques. La concentració es sol fer per evaporació, encara que els sistemes de concentració per membranes (ultrafiltració i osmosi inversa) mantenen més intactes les seves

característiques nutritives i funcionals. Després es deshidrata per atomització o en llet fluiditzat, ja que són els processos de deshidratació que produeixen menys modificacions de les propietats funcionals. La fracció cel·lular, amb un contingut en aigua del 65 %, és un producte concentrat i es pot deshidratar sense la necessitat d'una concentració prèvia (Ockerman i Hansen, 1994).

La deshidratació és un mètode de conservació que es basa en la disminució de l'activitat de l'aigua dels aliments, fins a nivells que impedeixen l'activitat microbiològica i que disminueixen al mínim les reaccions químiques i enzimàtiques de deteriorament, sense la necessitat d'utilitzar refrigeració durant el transport i el període d'emmagatzematge (Brennan, 1989). També comporta una disminució de les despeses d'emmagatzematge i distribució a causa de la disminució de pes i volum dels aliments deshidratats.

En els processos de deshidratació es produeixen dos fenòmens relacionats entre si, la transferència del calor sensible i del calor latent d'evaporació des del fluid calefactor cap al producte humit, i la transferència de massa, al mobilitzar-se l'aigua en forma de vapor, des de la superfície del producte cap al medi. Entre les capes del producte es creen gradients de temperatura i del contingut en aigua, que tendeixen a equilibrar-se mitjançant la transferència de calor des del medi assecant cap a les zones més fredes, i la migració d'aigua des de la capa més freda cap a la zona més calenta (Martín Yero *et al.*, 1995). La transmissió de calor en un procés de deshidratació es pot produir bàsicament per dos mecanismes: per convecció de l'aire calent, o bé per conducció a través d'una superfície calenta de bescanvi.

La deshidratació per atomització, polvorització o nebulització (*spray drying*) és un dels processos tecnològics més utilitzats per deshidratar productes líquids. Aquest procediment consisteix en polvoritzar un líquid en forma de petites gotes (esprai) per augmentar la superfície de transferència de calor; quan aquest entra en contacte amb un flux d'aire calent (de 150 a 300°C), que actua com a fluid calefactor i alhora com a vehiculador, es produeix una deshidratació quasi instantània de les gotes del producte. L'aire calent només cedeix el calor latent de vaporització al producte, mentre que aquest quasi que no augmenta sensiblement de temperatura, amb la qual cosa es minimitza el dany tèrmic sobre els components del producte i, per tant, el valor nutritiu, les característiques organolèptiques i les propietats funcionals dels productes deshidratats per atomització es conserven bastant intactes.

Existeixen diferents tipus d'atomitzadors dissenyats específicament per a cada producte alimentari, però estan destinats a aquells aliments o productes que es puguin atomitzar, és a dir, líquids o fluids de baixa viscositat com la llet, el sèrum de la llet, el cafè, extractes de te, purés i extractes de carn i peix, extractes de llevat, ous líquids, alguns sucres de fruita, colorants i aromatitzants, i proteïnes d'origen animal i vegetal, com per exemple les del plasma o de la fracció cel·lular de la sang.

Els components principals d'un deshidratador per atomització són: l'atomitzador pròpiament dit, que nebulitza el producte en forma de gotes petites; una cambra de deshidratació, on es produeix la transferència de calor i de matèria; un dispositiu per a l'escalfament de l'aire; i un sistema de ventilació que permeti la circulació de l'aire i el transport de la pols des de l'entrada de la cambra cap al recipient de recollida. Les partícules deshidratades, suspeses en el flux d'aire, es dirigeixen cap a un equip de separació, normalment un cicló-separador, connectat a la sortida de la cambra que, per diferència de densitat, permet separar i recuperar el producte deshidratat en forma de partícules en pols del flux d'aire humit, recollir-les i envasar-les, o sotmetre-les a altres tractaments com la instantaneïtzació, que permet obtenir productes amb una molt bona capacitat de reconstitució o rehidratabilitat (Brennan, 1996), com és el cas de les llets en pols, cacaus i cafès instantanis.

La trajectòria i la velocitat de partícules en pols a través del sistema determinen el temps de deshidratació, que sol ser molt ràpid, generalment entre 1 i 10 segons. Aquesta característica, minimitza la possibilitat de coagulació de les proteïnes i altres modificacions indesitjables produïdes per la calor en els sistemes clàssics de deshidratació, que es tradueixen en una disminució de la solubilitat i del valor nutritiu dels aliments deshidratats (Martín Yero *et al.*, 1995). El grau de deshidratació i el temps necessari per dur a terme el procés depenen de la temperatura de l'aire, del coeficient de transferència de calor i de la superfície de transferència de calor i, per tant, del diàmetre de les gotes (Toledo, 1991).

2.2 OBJECTIUS

El present capítol té com a principals objectius la determinació de les condicions del procés de deshidratació per atomització de la fracció cel·lular de la sang de porc d'escorxador i la caracterització físico-química i microbiològica del concentrat d'hemoglobina en pols obtingut després del tractament tecnològic.

Per determinar les condicions del procés de deshidratació per atomització de la fracció cel·lular es planteja estudiar l'efecte de la temperatura de deshidratació sobre el grau de deshidratació assolit i sobre la funcionalitat del producte, determinant el contingut en humitat, la solubilitat proteica i l'estabilitat tèrmica de la proteïna de mostres de fracció cel·lular deshidratades per atomització a diferents temperatures.

Pel que fa a la caracterització físico-química i microbiològica, els objectius són: conèixer la composició química del producte final; avaluar les seves característiques físiques i bioquímiques, així com la seva qualitat microbiològica, ambdós importants paràmetres a

tenir en compte si es vol utilitzar la fracció cel·lular en pols com a ingredient en productes alimentaris; i, finalment, determinar les isoterms de sorció del producte en pols.

- a) Per a la caracterització microbiològica de la fracció cel·lular s'han plantejat dos objectius concrets:
- Estudiar si el tractament d'hemòlisi de la fracció cel·lular amb ultrasons i la posterior centrifugació produeix una disminució de la contaminació microbiològica de la sang.
 - Determinar la contaminació general i investigar la presència d'algunes espècies de microorganismes específics a la fracció cel·lular hemolitzada i a la fracció cel·lular en pols, per observar si el tractament de deshidratació té un efecte de disminució de la càrrega microbiana.
- b) Els objectius de la caracterització físico-química de la fracció cel·lular en pols són:
- Determinar la composició química de la fracció cel·lular deshidratada per atomització.
 - Mesurar i caracteritzar de forma objectiva el color de la fracció cel·lular després de la deshidratació.
- c) Determinar les isoterms de sorció de la fracció cel·lular en pols i ajustar les dades de sorció obtingudes de forma experimental a un model matemàtic per conèixer la relació entre el contingut en aigua i l'activitat de l'aigua del producte, de manera que ens permeti obtenir informació sobre l'estabilitat microbiològica i bioquímica del producte deshidratat durant el període d'emmagatzematge.

2.3 MATERIAL I MÈTODES

2.3.1 Disseny experimental

Per dur a terme els objectius exposats del present capítol es varen realitzar una sèrie d'experiments que es resumeixen a continuació:

a) Obtenció de la fracció cel·lular hemolitzada

Es van recollir deu mostres de sang de porc que, després de la centrifugació per obtenir la fracció cel·lular (FC), es van dividir en cinc alíquotes, cadascuna de les quals es va hemolitzar prèviament a la seva deshidratació per atomització. Per escollir el sistema que utilitzaríem per hemolitzar la FC es van realitzar uns assaigs previs per determinar

l'eficàcia de la fragmentació mecànica i del tractament mitjançant ultrasons, observant el grau d'hemòlisi assolit en les mostres de FC fresca al microscopi després de cada tractament.

b) Determinació de les condicions del procés tecnològic de deshidratació per atomització

Per establir les condicions més adequades d'operació pel procés de deshidratació del concentrat d'hemoglobina (FC hemolitzada) per atomització es varen dur a terme dos tipus d'experiments:

- Determinació del cabal òptim d'alimentació del producte a la cambra de deshidratació.
- Investigació dels efectes de la temperatura utilitzada en el tractament tecnològic sobre les característiques físico-químiques i funcionals del producte final. Les deu mostres diferents de FC hemolitzades es van deshidratar per atomització amb diferents temperatures de l'aire i, posteriorment, es varen analitzar el grau de deshidratació assolit, el manteniment de la solubilitat proteica i l'estabilitat tèrmica del producte en pols obtingut.

c) Caracterització microbiològica de la fracció cel·lular

Es varen dur a terme dos tipus d'assaigs microbiològics sobre cadascuna de les deu repeticions de FC:

- Per una banda, es va estudiar si el tractament amb ultrasons i posterior centrifugació que aplicàvem a la FC fresca produïa una disminució de la contaminació microbiològica general de la primera matèria.
- L'altre tipus d'assaig fou la determinació de la contaminació general i de la presència d'algunes espècies de microorganismes específics a la primera matèria (la FC hemolitzada abans de la deshidratació) i a la FC en pols, per observar si el tractament de deshidratació per atomització tenia un efecte de disminució de la càrrega microbiana.

d) Caracterització físico-química de la fracció cel·lular hemolitzada deshidratada per atomització

Una vegada descrites les condicions més òptimes d'operació per deshidratar per atomització la FC hemolitzada vàrem determinar la composició química del producte en pols (contingut en humitat, proteïna, greix i sals minerals) i les seves coordenades de color per tal de caracteritzar bioquímicament i física el nostre producte després del procés tecnològic. Aquests estudis es van realitzar sobre deu mostres de FC en pols.

e) Determinació de l'activitat de l'aigua i de les isoterms de sorció de la fracció cel·lular hemolitzada deshidratada per atomització

Per determinar l'activitat de l'aigua i les isoterms de sorció de la FC deshidratada per atomització es van utilitzar tres mostres de FC hemolitzada que havien estat deshidratades per atomització a les condicions d'operació establertes. Les mostres es van escollir a l'atzar i es van identificar com A, B i C.

2.3.2 Procedència de les mostres de sang

Les mostres de sang de porc es varen recollir en un escorxador industrial de la comarca del Gironès. Aquest escorxador utilitza un sistema d'atordiment amb diòxid de carboni i un dessagnat vertical. El sistema de recollida de la sang es tracta d'un sistema obert modificat perquè aplica una sèrie de mesures higièniques després de la seva obtenció. La sang es recull en una pila de sagnat, immediatament se li addiciona una solució anticoagulant de citrat sòdic al 0,4 % (p/v), es refreda ràpidament mitjançant un bescanviador de calor i s'emmagatzema en un dipòsit en refrigeració (5°C) fins que és recollida diàriament per una empresa especialitzada.

Les mostres de sang van ser recollides en ampolles de vidre estèrils. La sang provenia de l'aixeta inferior del dipòsit d'emmagatzematge, i es va rebutjar sempre el primer broll contingut en l'aixeta ja que possiblement estava més contaminat microbiològicament. El transport de la sang fins al laboratori es va fer en bosses isotèrmiques, proveïdes d'acumuladors tèrmics, per tal de no trencar la cadena del fred i evitar el seu possible deteriorament.

2.3.3 Obtenció de la fracció cel·lular hemolitzada en pols

En aquest apartat es descriuen els diferents tractaments que es varen aplicar a la sang de porc provinent de l'escorxador per obtenir la FC hemolitzada i deshidratada per atomització.

2.3.3.1 Obtenció de la fracció cel·lular

La FC es va obtenir per fraccionament de la sang mitjançant centrifugació i posterior decantació de la fracció plasmàtica. Les mostres de sang es van centrifugar a una velocitat de 2530 x g (Sorvall RC-5C Plus, Dupont Co., Newton, Connecticut, U.S.A.) durant 15 minuts i a una temperatura d'entre 5 i 10°C.

2.3.3.2 Hemòlisi de la fracció cel·lular

La FC conté aproximadament un 90 % de la proteïna en forma d'hemoglobina (Hb). Per poder extreure aquesta Hb de l'interior dels eritròcits i aprofitar-la, s'ha de produir un trencament de la membrana cel·lular. Per tant, abans del procés de deshidratació, la FC es sotmetia a un procés d'hemòlisi dels glòbuls vermells.

Existeixen diferents mètodes físics i químics per hemolitzar la FC. La lisi de les membranes cel·lulars es pot induir per diferència de pressió osmòtica, per fragmentació mecànica o mitjançant ultrasons. En el nostre cas, l'hemòlisi per diferència de pressió osmòtica es va descartar doncs suposaria una dilució i, en conseqüència, un menor rendiment en el procés de deshidratació, així com un elevat cost energètic. Es varen realitzar una sèrie de proves preliminars per determinar l'eficàcia de la fragmentació mecànica i de l'aplicació dels ultrasons per hemolitzar els eritròcits.

La fragmentació mecànica de l'estroma mitjançant un homogeneïtzador de ganivetes Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Littau, Suïssa) no produïa una hemòlisi generalitzada, possiblement perquè el sistema no permetia que la totalitat del volum assajat entrés en contacte amb les ganivetes de l'eix agitador.

Hemòlisi de la fracció cel·lular per ultrasonicació

L'aplicació dels ultrasons és un tractament molt utilitzat per lisar cèl·lules, per exemple per extreure enzims intracel·lulars. A les indústries alimentàries els ultrasons s'utilitzen amb diferents finalitats tecnològiques: homogeneïtzació i emulsificació, com a procés de conservació per la seva capacitat de destrucció de microorganismes, desgasificació de líquids, tenderització del teixit carni, millora de les reaccions de polimerització i despolimerització, envelliment de vins i licors i tractaments de neteja, entre d'altres.

La sonicació es basa en l'aplicació d'ultrasons, ones vibratòries similars a les ones sonores de freqüència de més de 16 kHz. L'aplicació dels ultrasons en un fluid dóna lloc a un fenomen anomenat cavitació. La cavitació és la capacitat que tenen els ultrasons de formar i destruir cavitats en un líquid. Les cavitats, que poden estar buides o contenir gas o vapor al seu interior, es produeixen per variacions de pressió al fluid. Les bombolles van incrementant el seu volum a mida que augmenta la pressió al seu interior, fins a arribar a pressions de varies mils d'atmosferes (Carlin, 1972). Quan la pressió és suficientment elevada com per produir el colapse i trencament de les bombolles (implosió), es produeixen unes ones de xoc, responsables de la destrucció de la membrana cel·lular. L'efecte de la cavitació està potenciat per un increment de temperatura i de pressió que els ultrasons causen a l'interior de les cèl·lules i que debiliten la seva membrana cel·lular. L'eficàcia d'un tractament amb ultrasons depèn

principalment de paràmetres ambientals, com el pH, la temperatura, la força iònica del medi de suspensió i el temps d'exposició.

Així doncs, després del fraccionament de la sang, es va procedir a induir l'hemòlisi dels eritròcits mitjançant ultrasonicació. L'aparell utilitzat per ultrasonificar la FC va ser una sonda de laboratori LabSonic U (B. Braun-Biotech, S.A., Melsungen, Alemanya). Es varen assajar diferents condicions del tractament, regulant la potència i el temps d'aplicació, per determinar quin d'ells permetia la màxima eficàcia sense que la mostra augmentés sensiblement de temperatura. Les proves es varen realitzar sobre alíquotes de 250 mL de FC, mantenint les mostres en repòs durant intervals d'un minut entre cada tractament i tenint la precaució de realitzar-ho sobre un bany de gel per contrarestar el possible escalfament produït pels ultrasons.

Per determinar l'eficàcia de l'hemòlisi es varen observar les mostres al microscopi després de cada tractament. Les condicions d'ultrasonicació assajades varen ser les següents:

- a) Quatre períodes de 2 minuts a 100 W de potència, amb 1 minut de descans entre tractaments.
- b) Tres períodes de 2 minuts a 100 W de potència, amb 1 minut de descans.
- c) Tres períodes de 2 minuts a 75 W de potència, amb 1 minut de descans.

Els tres tractaments assajats produïen de forma òptima el trencament de la membrana dels eritròcits, però en el segon i especialment en el primer, l'augment de temperatura era sensiblement major, mentre que en el tercer l'escalfament de la mostra era menyspreable. Per aquesta raó, el tractament amb ultrasons de tres períodes de 2 minuts a 75 W de potència, amb 1 minut de descans entre ells, va ser l'escollit com a mètode per a produir l'hemòlisi de la FC de la sang de porc prèviament a la seva deshidratació per atomització. Després de la ultrasonicació, per tal de separar els components de les membranes (estroma) del concentrat d'Hb de l'interior de les cèl·lules lisades, la FC hemolitzada es va centrifugar a una velocitat de $20900 \times g$, durant 30 minuts i a una temperatura d'entre 15 i 20°C.

2.3.3.3 Deshidratació per atomització de la fracció cel·lular hemolitzada

La FC hemolitzada es va deshidratar per atomització en un equip de laboratori Spray-Dryer SD-05 (Lab-Plant Ltd., Huddersfield, West Yorkshire, Anglaterra), l'esquema del qual es mostra a la Figura 2.1. El sistema d'atomització o nebulització es tracta d'una tovera a pressió, amb un desbloquejador per evitar que s'obturi l'orifici de sortida de l'injector (de 0,5 mm de diàmetre), en el qual el líquid és injectat a pressió fent-lo passar a través d'un orifici de diàmetre molt petit o estrangulament; la diferència de pressió entre

l'exterior i l'interior provoca l'aspersió del líquid en forma de gotes. En aquest equip el flux d'aire calent i l'alimentació del producte es produeixen en la mateixa direcció i l'aire s'escalfa mitjançant una resistència elèctrica.

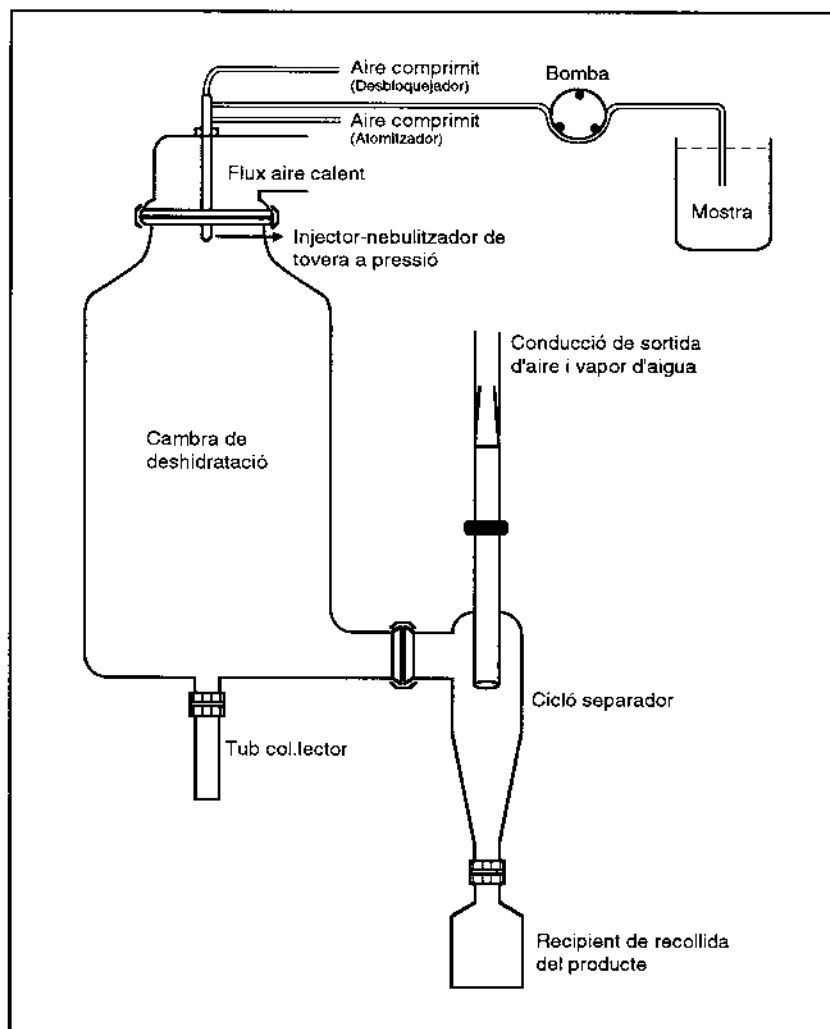


Figura 2.1: Esquema de l'equip de deshidratació per atomització (LabPlant Spray Dryer SD-05).

2.2.4 Determinació de les condicions del procés de deshidratació per atomització de la fracció cel·lular hemolitzada

Pel que fa als paràmetres de deshidratació, es varen fixar el flux de l'aire i la pressió del compressor a les condicions màximes que permetia l'equip, essent $64 \text{ cm}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ i 2 bars, respectivament, i es van assajar diferents condicions del tractament tecnològic, regulant les variables del procés que tenen una influència més directa sobre el grau de deshidratació, tenint en compte també altres paràmetres de qualitat del producte final.

Es varen fer unes proves preliminars per determinar el cabal òptim d'alimentació del producte, provant a 0,52; 0,9; 1,36 i 1,8 L·h⁻¹, essent el cabal de 0,9 L·h⁻¹ el que permetia la correcta aspersion de la FC i, per tant, l'atomització, obtenint un diàmetre de partícula òptim per a la deshidratació. Amb cabals inferiors s'obtenien partícules en pols de diàmetre massa petit que no es podien recuperar a través del cicló, mentre que cabals superiors no permetien una correcta deshidratació del producte.

Un cop fixats el flux de l'aire, la pressió del compressor i el cabal d'alimentació de la bomba es van assajar diferents temperatures de deshidratació per atomització del concentrat d'Hb per optimitzar el procés tecnològic. Les temperatures del flux de l'aire d'entrada utilitzades varen ser: 120, 130, 140, 150 i 160°C i les de sortida oscil·laven entre 55 a 75°C, en funció de les d'entrada. A la Figura 2.2 es mostra el diagrama de flux del procediment seguit en aquest estudi per obtenir les diferents mostres de FC en pols. Totes les mostres de FC en pols es van envasar en recipients de plàstic estèrils tancats immediatament després de la seva deshidratació, i es van emmagatzemar a temperatura ambient.

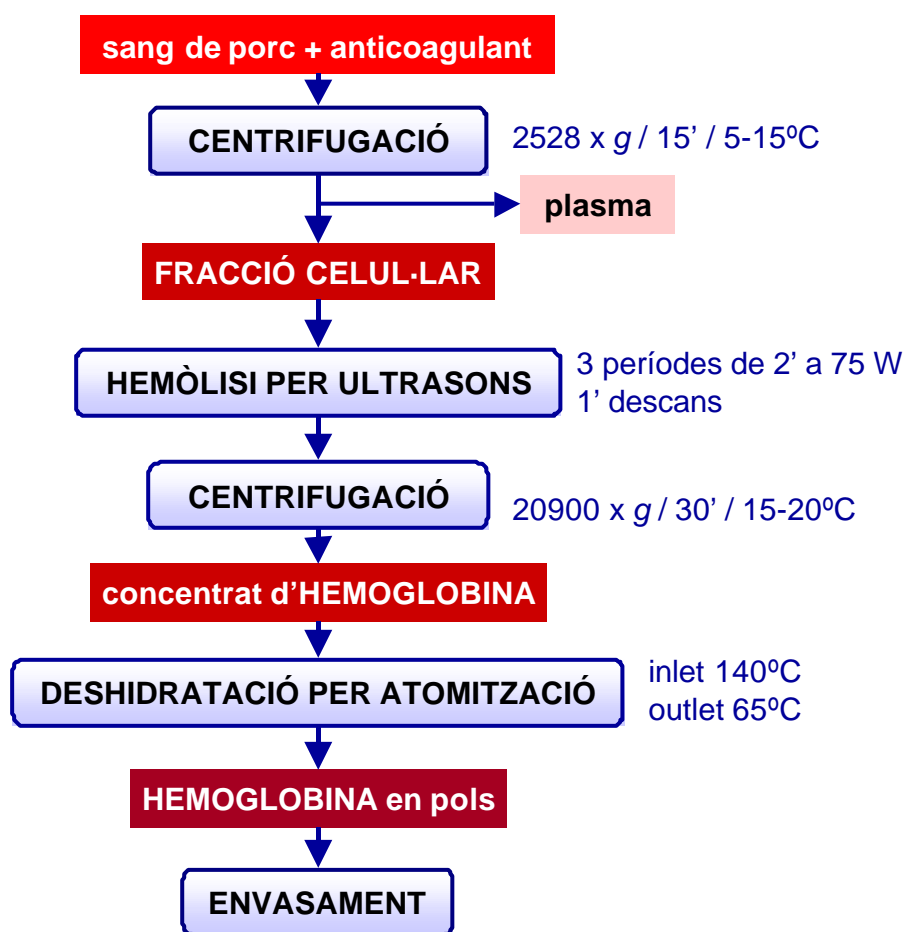


Figura 2.2: Diagrama de flux del procés tecnològic d'obtenció de la FC hemolitzada (concentrat d'Hb) deshidratada per atomització.

Per a la determinació de les millors condicions de deshidratació de la FC hemolitzada per atomització, es varen avaluar diferents paràmetres que ens permetien determinar la qualitat final de les mostres en pols i la seva estabilitat durant el període d'emmagatzematge, així com la determinació del grau de desnaturalització proteica produïda pel tractament tecnològic. Es varen avaluar el contingut en humitat i la solubilitat proteica de mostres de FC deshidratades per atomització en diferents condicions de temperatura. També es va dur a terme una anàlisi calorimètrica, amb la tècnica DSC, de la FC fresca i de la FC en pols, per estudiar l'efecte del tractament tecnològic sobre l'estabilitat de l'Hb.

2.2.4.1 Contingut en humitat

El contingut en humitat de la FC fresca hemolitzada i de la FC deshidratada a diferents temperatures es va determinar com el percentatge de pes perdut per dessecació de les mostres a l'estufa a $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ fins assolir pes constant (ISO R-1442). Totes les determinacions es varen fer com a mínim per duplicat. Es va utilitzar una estufa de dessecació per convecció natural (Selecta) i una balança analítica de 0,1 mg de precisió (Sartorius, model Basic).

2.2.4.2 Solubilitat proteica

La solubilitat proteica de la FC hemolitzada i deshidratada es va determinar mitjançant la tècnica descrita per Morr *et al.* (1985) que consistia en pesar 0,5 g de FC en pols, amb precisió d'un mg, en un vas de 100 mL i dissoldre-la en 40 mL d'aigua destil·lada mitjançant agitació constant. La solució s'ajustava a pH 7,5. Un cop obtinguda la dispersió completa de la mostra, es deixava en agitació durant una hora amb un agitador magnètic, evitant que es produís vòrtex. La dispersió es transferia a un flascó volumètric de 50 mL i s'enrasava amb aigua destil·lada. La dissolució es centrifugava a $20000 \times g$ durant 30 minuts a temperatura ambient i es recollia el sobrenedant.

Finalment, es va determinar el contingut en proteïna del sobrenedant pel mètode Kjeldahl (veure apartat 2.2.6.1). Per calcular el percentatge de solubilitat proteica es va determinar la relació entre el contingut en proteïna del sobrenedant respecte el de proteïna total de la FC (determinat pel mètode Kjeldahl).

2.2.4.3 Anàlisi calorimètrica per DSC

Per obtenir informació sobre el grau de desnaturalització proteica patida durant el procés de deshidratació per atomització, es varen estudiar les propietats tèrmiques de la FC

fresca, la FC en pols i d'un patró d'Hb de sang de porc mitjançant la tècnica DSC (*Differential Scanning Calorimetry*). L'anàlisi calorimètrica diferencial ens va permetre comparar les propietats tèrmiques de la FC fresca i/o dels patrons d'Hb de sang de porc amb la FC deshidratada per atomització, així com observar les diferències entre les mostres deshidratades en funció de la temperatura de deshidratació.

Aquesta tècnica es basa en la mesura de la diferència d'entrada d'energia entre una substància i un material de referència en funció de la temperatura, mentre la substància i el material de referència estan sotmeses a un programa d'escalfament controlat. L'aparell mesura l'energia necessària per mantenir un balanç nul de temperatura entre la mostra i la referència (Ma *et al.*, 1990). L'anàlisi calorimètrica permet mesurar propietats físiques de diferents substàncies i detectar transicions de primer ordre relacionades amb modificacions de l'estructura nativa de les molècules, com per exemple la desnaturalització proteica o la gelificació del midó. Els tractaments tèrmics induïxen canvis en l'estructura nativa de les proteïnes que poden conduir a una agregació dels polipèptids desnaturalitzats per formar una espècie de coàgul o un gel.

El fenomen de desnaturalització tèrmica es pot detectar com un pic endotèrmic als termogrames DSC, doncs el trencament dels ponts d'hidrogen intramoleculars és una reacció endotèrmica. En canvi, l'agregació o el trencament de les interaccions hidrofòbiques són de naturalesa exotèrmica. Per tant, el valor de l'entalpia (ΔH), calculat a partir de l'àrea del pic endotèrmic de transició, pot donar una estimació de l'energia tèrmica necessària per desnaturalitzar la proteïna. A partir dels termogrames també es pot determinar la temperatura en la qual es produeix la desnaturalització (T_d) que es correspon amb la temperatura del pic de transició. Aquests dos paràmetres ens permeten obtenir informació dels efectes dels diferents tractaments tecnològics sobre els components dels aliments (Arntfield *et al.*, 1990).

Els estudis dels paràmetres calorimètrics es van realitzar amb un instrument DSC 30 Mettler (Mettler-Toledo, S.A.E., Suïssa) amb nitrogen líquid. Les temperatures i energies es van calibrar mitjançant un patró de zinc, indi i plom, sota les mateixes condicions d'operació que les mostres sotmeses a estudi. Es van assajar alíquotes de 100 μL de mostres de FC fresca, FC en pols (deshidratades per atomització a diferents temperatures) i d'un patró d'Hb de sang porcina (*Sigma Chemical Co.*, St. Louis, USA), les dues últimes reconstituïdes al 35 % (p/p), contingudes en càpsules d'alumini de 150 μL tancades hermèticament a pressió. Les càpsules de referència contenien un volum d'aigua destil·lada equivalent al contingut en humitat de les mostres (65 μL) amb la finalitat d'obtenir una línia de base recta. Les anàlisis calorimètriques de cada mostra es varen fer com a mínim per triplicat, escalfant des de 30 a 100°C i amb una velocitat d'escalfament de 3°C per minut (Parés *et al.*, 1998a).

Dels termogrames obtinguts, es va calcular l'àrea del pic de transició endotèrmic, mitjançant integració, utilitzant una línia de base recta, a partir del qual vàrem determinar la variació de l'Entalpia de transició del procés de desnaturalització proteica (DH) en Joules per gram de mostra. També es va obtenir la temperatura de desnaturalització proteica (Td) de les diferents mostres, considerant que es corresponia amb la temperatura en la qual es donava el mínim del pic endotèrmic dels termogrames.

2.2.5 Caracterització microbiològica de la fracció cel·lular

La caracterització microbiològica es va dur a terme sobre 10 mostres diferents de FC fresca, FC hemolitzada per ultrasonicació, i FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C (10 repeticions). Totes les determinacions microbiològiques es varen fer el mateix dia que es recollien i processaven les mostres i es van realitzar en una cabina de flux laminar Telstar BV-100 (Telstar S.A., Terrassa, Barcelona).

Per a cadascuna de les mostres, es van fer una sèrie de dilucions decimals que es van creure pertinents per a cada grup o espècie de microorganisme estudiat, tenint en compte també la tècnica utilitzada per sembrar. Aquestes dilucions es van fer amb Aigua de Triptona ^{M.1} (Oxoid Ltd., Basingstoke, Anglaterra).

2.2.5.1 Recompte de microorganismes aerobis mesòfils viables

Es van sembrar, per la tècnica de la sembra en massa, 1 mL de les dilucions pertinents en el medi de cultiu de recompte general no selectiu Base Agar Sang ^{M.2} (Oxoid Ltd., Basingstoke, Anglaterra) líquid i temperat. Les plaques es van incubar en una estufa de cultiu a $31 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 48 hores i posteriorment es procedia al recompte de les colònies crescudes en el medi, tant en l'interior com en la superfície.

M.1 :	Aigua de Triptona (TW, Oxoid CM 87)	composició (g·L ⁻¹)
	pH: 7,5 ± 0,2	
	Triptona	10
	Clorur sòdic	5
M.2 :	Base Agar Sang (BAB, Oxoid CM 55)	composició (g·L ⁻¹)
	pH: 7,3 ± 0,2	
	Pols "Lab-Lemco"	10,0
	Peptona	10,0
	Clorur sòdic	5,0
	Agar	15,0

2.2.5.2 Recompte de *Staphylococcus aureus*

Es va realitzar per la tècnica de sembra en superfície en medi Baird Parker ^{M.3} (Oxoid Ltd.) amb un suplement d'emulsió estèril de Rovell d'ou i Tel-lurit potàssic (Oxoid Ltd.), de 0,1 mL de les dilucions pertinents i es va disseminar amb una nansa de *Digralsky* estèril. Un cop sembrades les plaques es varen incubar a 37°C durant 48 h. Finalment es procedia a la lectura de les colònies sospitoses. Les colònies de *S. aureus* són rodones, convexes, de 2-3 mm de diàmetre, negres, brillants, envoltades d'una zona opaca i han creat un halo transparent de lipòlisi al seu voltant.

2.2.5.3 Recompte de Clostridis sulfit reductors

Amb una pipeta es van inocular en profunditat 1 mL de cada dilució en un tub que contenia 10 mL del medi de cultiu selectiu Agar Sulfit-Polimixina-Sulfadiacina ^{M.4} (Difco Lab., Detroit, USA) i s'afegia aproximadament 1 mL de vaselina estèril per aconseguir condicions d'anaerobiosi. Els tubs es van incubar a 37°C durant 48 h i el recompte es va realitzar a les 24 i a les 48 h. Les colònies de clostridis s'observen de color negre per la precipitació de sals de sulfur de ferro.

^{M.3} :	Agar Baird Parker (BP, Oxoid CM 275)	composició (g·L ⁻¹)
	pH: 6,8 ± 0,2	
		Triptona 10,0
		Pols "Lab-Lemco" 5,0
		Extracte de llevat 1,0
		Piruvat sòdic 10,0
		Glicina 12,0
		Clorur de liti 5,0
		Agar 20,0

Addició d'un complement d'emulsió estèril de Rovell d'ou amb Tel-lurit potàssic, al 0,01 % (p/v) de Tel-lurit (Oxoid SR 0554 C).

^{M.4} :	Agar Sulfit-Polimixina-Sulfadiacina	composició (g·L ⁻¹)
	(SPS, Difco 0845-17-0)	
	pH: 7,0 ± 0,2	
		Triptona 15
		Extracte de llevat 10
		Citrat fèrric 0,5
		Sulfit de sodi 0,5
		Tioglicolat de sodi 0,1
		Tween 80 0,05
		Sulfadiacina 0,12
		Sulfat de Polimixina B 0,01
		Agar 15

2.2.6 Caracterització físico-química de la fracció cel·lular hemolitzada i deshidratada per atomització

2.2.6.1 Composició química de la fracció cel·lular en pols

Les determinacions físico-químiques es varen fer com a mínim per duplicat sobre 10 mostres diferents de FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C, essent aquesta la temperatura escollida per deshidratar el nostre producte en base als resultats obtinguts en la optimització del procés tecnològic.

a) Humitat

El contingut en humitat de la FC deshidratada per atomització es va determinar segons el procediment descrit en l'apartat 2.2.4.1.

b) Proteïna

La determinació del contingut en proteïna total de cada mostra de FC en pols i del sobrenedant per a la determinació de la solubilitat es va realitzar pel mètode Kjeldahl (ISO R-937; A.O.A.C. 65, 1339 (1980)). Es va utilitzar un digestor (Selecta Bloc-Digest) i un destil·lador Kjeldahl automàtic (Selecta Dosi-Gen S-511). Totes les determinacions es varen fer per duplicat. Es va utilitzar un factor de conversió de percentatge de nitrogen a percentatge de proteïna de 6,25.

c) Greix

Per determinar el percentatge de greix es va realitzar l'extracció dels lípids de les mostres, prèviament hidrolitzades i dessecades, en un extractor Soxhlet, utilitzant com a dissolvent orgànic una solució d'èter etílic i èter de petroli (1:1). Posteriorment es procedia a l'eliminació del dissolvent per evaporació i a la determinació del percentatge de greix en cada mostra per gravimetria (ISO-1443; A.O.A.C. 65, 289 (1980)). Es va utilitzar una balança analítica Sartorius de 0,1 mg de precisió.

d) Cendres

El percentatge de sals minerals es va determinar gravimètricament després de la incineració de les mostres, prèviament dessecades a l'estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$, en un forn mufla a uns 550°C durant el temps necessari per assolir un pes constant (ISO R-936). L'elevada presència de ferro a l'Hb era la responsable del color vermellós de les cendres obtingudes. Es va utilitzar una estufa de dessecació per convecció natural (Selecta), un forn mufla (Naber) i una balança analítica de 0,1 mg de precisió (Sartorius).

2.2.6.2 Caracterització dels paràmetres de color de la fracció cel·lular en pols

El color és una característica organolèptica dels aliments molt difícil de caracteritzar doncs es tracta d'una percepció humana, resultat d'una complexa sèrie de respostes fisiològiques i psicològiques a la radiació electromagnètica de longituds d'ona compreses en l'interval de 400 a 700 nm, que dona lloc a una interpretació subjectiva. Així, per expressar de forma verbal un mateix color, diferents persones donen diferents referències, de manera que resulta molt difícil definir objectivament el color exacte d'un objecte. La determinació del color dels productes alimentaris de forma objectiva es pot dur a terme de forma instrumental, de manera que aquest es pugui mesurar i quantificar. La llum reflexada provinent d'un objecte és un estímul visual i és la que s'utilitza per a realitzar la mesura objectiva del color.

Aquesta llum reflexada es pot dividir en tres components primaris, els quals s'anomenen To (*Hue*), Lluminositat (*Value*) i Saturació (*Chroma*). El To és la longitud d'ona reflexada predominant, que determina que el color percebut sigui vermell, groc, verd, blau, etc.; la Lluminositat o Claredat es refereix a la quantitat de blanc o de negre que té el color, és a dir, si un color és clar o fosc, i permet classificar-lo com a la sensació produïda per algun element de l'escala de grisos; i la Saturació del color o Cromacitat es refereix a la intensitat o força del color, o dit d'una altra manera, el grau en què un color es separa del gris neutre i s'acosta a un color pur de l'espectre. El To i la Saturació conjuntament formen el cromatisme de la sensació del color. Per tant, el color d'un objecte es pot definir com una combinació d'aquests tres elements primaris del color.

La Comissió Internacional de la Il·luminació (*Commission International de l'Eclairage-CIE*) va definir el sistema numèric CIE $L^* a^* b^*$ per expressar de forma més precisa la percepció del color dels objectes. Aquest sistema es basa en l'ús d'observadors i fonts d'il·luminació estàndards i actualment és el més utilitzat per a la descripció exacta del color mitjançant uns paràmetres que fan referència als tres components esmentats.

Quan el color s'expressa per aquest sistema, la Lluminositat és " L^* " (100, blanc; 0, negre), el To i la Saturació estan representats per " a^* " (vermell, +; verd, -) i " b^* " (groc, +; blau, -) conjuntament. La Saturació o "Croma" (C^*) ve descrita per l'equació $C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$ (Clydesdale, 1984; Guzman *et al.*, 1995). Els tres elements del color (Lluminositat, To i Saturació) es poden visualitzar de forma gràfica en un sistema de tres dimensions (Figura 2.3), on el To es troba a l'exterior, al voltant de l'eix central (formant la "roda dels colors"), i la Lluminositat i la Saturació formen l'eix vertical i l'eix horitzontal des del centre, respectivament. Les coordenades $L^*a^*b^*$ varien en funció del color i es poden representar gràficament per obtenir un diagrama de cromaticitat específic per a cada color, com el que es mostra a la Figura 2.4.

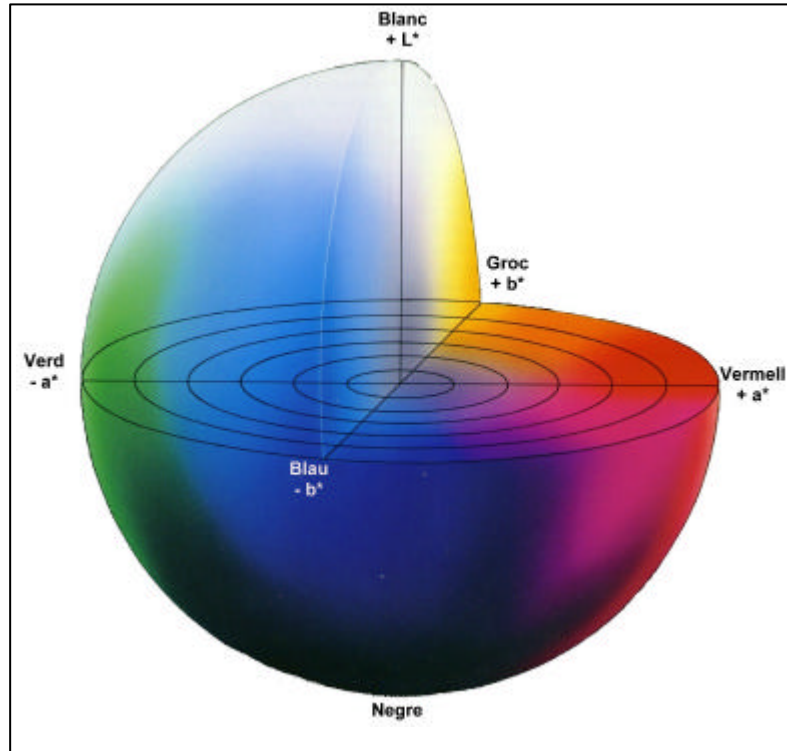


Figura 2.3: Representació tridimensional del sòlid de color segons l'espai de color CIE $L^*a^*b^*$ (Minolta Co., 1994).

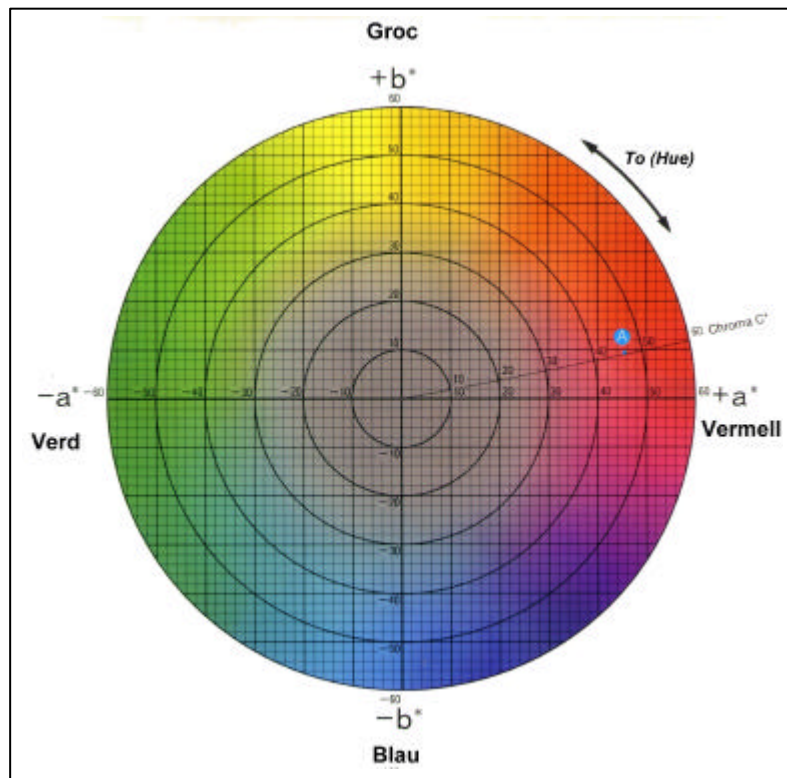


Figura 2.4: Diagrama de Cromaticitat a^* , b^* que representa la visió d'un tall horitzontal del sòlid de color a un valor de L^* constant (Minolta Co., 1994).

En aquest estudi es van caracteritzar els paràmetres de color de 10 mostres de FC hemolitzada que havien estat deshidratades per atomització a 140°C. La determinació de les coordenades cromàtiques es va fer mitjançant el sistema CIE $L^*a^*b^*$, amb un colorímetre Minolta CR-300 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japó) calibrat mitjançant la placa de referència estandarditzada corresponent al blanc. Aquest colorímetre utilitza un sistema d'il·luminació difusa, una geometria d'observació amb un angle de visió de 0°, un observador estàndard a 2° i presenta una àrea de mesura de 8 mm de diàmetre, de manera que només la llum reflexada perpendicularment sobre la superfície de l'objecte és recollida pel cable òptic per realitzar les anàlisis del color. Les mesures de color es van dur a terme utilitzant l'il·luminant universal estàndard D_{65} (corresponent a la llum diürna i que inclou la regió ultraviolada de la longitud d'ona).

Es va utilitzar un conus de projecció de vidre (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japó) dissenyat per adaptar el capçal de mesura del colorímetre a productes en pols o particulats. Sobre cada mostra de FC en pols es varen realitzar com a mínim tres lectures dels paràmetres L^* , a^* i b^* , girant cada mostra uns 90° entre lectures.

2.2.7 Activitat de l'aigua i isoterms de sorció de la fracció cel·lular hemolitzada i deshidratada per atomització

2.2.7.1 Determinació de l'activitat de l'aigua

La determinació de l'activitat d'aigua (a_w) de la FC en pols es va realitzar pel mètode de la interpolació gràfica, basat en la determinació del contingut en humitat de la mostra després que aquesta assolixi l'equilibri amb una atmosfera d'humitat relativa coneguda. El mètode de la interpolació gràfica és una tècnica gravimètrica que es fonamenta en la detecció de l'augment o la disminució de pes de les mostres d'aliment col·locades en unes cambres estanques, plaques de vidre o recipients tipus *twist-off*, en els quals es mantenen diferents humitats relatives durant un determinat període de temps i a temperatura constant.

Si es representen les variacions de pes de les mostres en funció de la humitat relativa, l' a_w de la mostra es correspon amb el punt de variació de pes nul, és a dir, on la corba obtinguda talla a la recta horitzontal de variació de pes zero i que es correspon a una determinada a_w . Amb aquest mètode, si s'utilitzen mostres de diferents humitats, també es poden obtenir les isoterms d'equilibri del producte. Es varen utilitzar tres solucions de sals saturades que proporcionaven una humitat relativa constant a 20°C (Taula 2.1):

Taula 2.1: Activitats de l'aigua i humitats relatives en l'equilibri a 20°C de les solucions saturades de les sals utilitzades en la determinació de l'activitat de l'aigua de la FC en pols.

Sal	a_w (20°C)	HRE (%)
Acetat potàssic, $K(C_2H_3O_2)$	0,200	20,0
Clorur magnèsic-6-hidrat, $MgCl_2 - 6 H_2O$	0,336	33,6
Nitrat de zenc-6-hidrat, $Zn(NO_3)_2 - 6 H_2O$	0,420	42,0

Adaptat de Banwart (1982).

Les solucions saturades de les sals van ser introduïdes en recipients de vidre amb tapa *twist-off* d'uns 450 mL que tancaven hermèticament, obtenint d'aquesta manera un ambient a l'interior del pot amb una humitat relativa constant i característica de cada solució saturada. S'introduïen aproximadament uns 0,5 g de les mostres de FC en pols analitzades, les mostres A, B i C deshidratades per atomització a 140°C, en gressols de vidre de pes conegut, col·locats sobre uns suports a l'interior dels recipients tal com es mostra a la Figura 2.5.

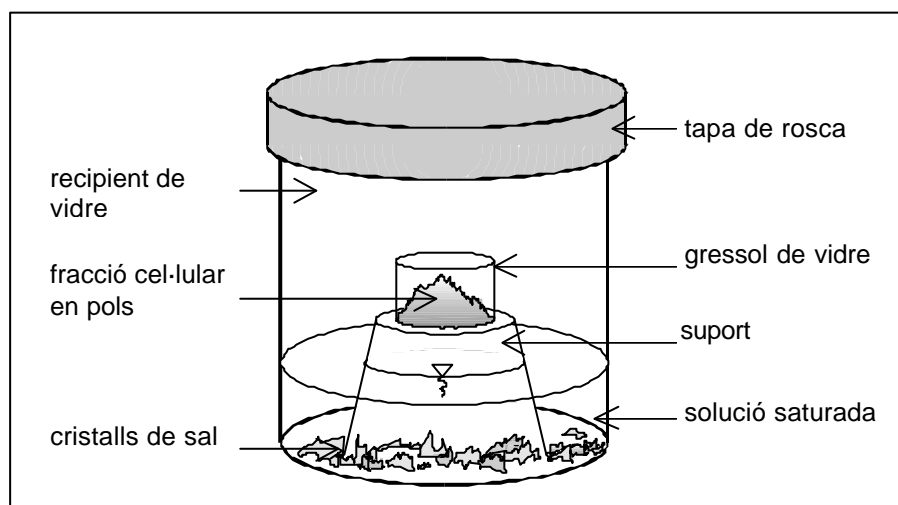


Figura 2.5: Esquema del dispositiu utilitzat per a la determinació de l' a_w i de les isoterms de sorció pel mètode gravimètric. (Font: Busquets, 1996).

Els gressols, prèviament, havien estat condicionats a la humitat relativa corresponent durant 24 h i a 20°C, per tal de conèixer el seu pes a la corresponent a_w . Després de tapar-los hermèticament es varen emmagatzemar a 20°C durant 7 dies. Passat el temps, les mostres van ser pesades de nou per determinar-ne el percentatge de variació de pes. Cada determinació es va realitzar per duplicat. Es van representar les variacions de pes de les mostres en funció de la humitat relativa, i la determinació de l' a_w de cada mostra es feia a partir de la recta de regressió. Per realitzar aquest estudi es va utilitzar un

refritherm (Hotcold-M, Selecta) per mantenir les mostres a una temperatura constant de 20°C, una estufa de dessecació per convecció natural (Selecta) i una balança analítica de 0,1 mg de precisió (Sartorius, model Basic).

2.2.7.2 Determinació experimental de les isoterms de sorció

La determinació de les isoterms de sorció és de gran utilitat per conèixer la relació entre l'activitat de l'aigua i el contingut en aigua dels aliments. La determinació de les isoterms de sorció es va dur a terme experimentalment, mesurant el percentatge d'humitat de la FC deshidratada (g d'aigua per 100 g de matèria seca) després d'estar en un ambient amb una humitat relativa i temperatura constants durant una setmana. Per realitzar aquest estudi es van utilitzar diferents solucions saturades de sals amb una activitat d'aigua coneguda a 20°C (Taula 2.2) que proporcionaven una atmosfera a l'interior del pot amb una humitat relativa constant. Es van analitzar tres mostres de FC en pols (A, B i C) representatives del producte que havien estat deshidratades per atomització a 140°C. Per realitzar l'estudi de les isoterms de sorció es va utilitzar el mateix dispositiu que el de la determinació de l' a_w que es mostra a la Figura 2.5.

Taula 2.2: Activitats de l'aigua i humitats relatives en l'equilibri a 20°C de les solucions saturades de les sals utilitzades per determinar les isoterms de sorció de la FC en pols.

Sal	a_w (20°C)	HRE (%)
Acetat potàssic, K (C ₂ H ₃ O ₂)	0,200	20,0
Clorur magnèsic-6-hidrat, MgCl ₂ - 6 H ₂ O	0,336	33,6
Carbonat potàssic, K ₂ CO ₃	0,435	43,5
Nitrat magnèsic-6-hidrat, Mg (NO ₃) ₂ - 6 H ₂ O	0,549	54,9
Nitrit sòdic, NaNO ₂	0,656	65,6
Clorur sòdic, NaCl	0,755	75,5
Sulfat de coure-5-hidrat, CuSO ₄ - 5 H ₂ O	0,980	98,0

Adaptat de Banwart (1982).

Per a la determinació de les isoterms d'adsorció es van col·locar aproximadament uns 0,5 g de les mostres de FC deshidratades per atomització a 140°C en recipients que contenien solucions saturades que proporcionaven una humitat relativa creixent del 33,6 al 98 % a 20°C. Passats set dies, es van determinar els continguts en humitat en equilibri de les diferents mostres, per obtenir el comportament del producte quan absorbeix humitat. Per determinar les isoterms de desorció, les mostres de FC en pols es van

mantenir durant una setmana en una humitat relativa constant del 98 %, mitjançant la solució saturada de sulfat de coure. Posteriorment es varen col·locar en ambients amb humitats relatives decreixents, del 75,5 al 20 %, i es va determinar la quantitat d'aigua retinguda per les mostres al cap d'una setmana.

Els continguts en humitat en equilibri es van determinar mitjançant dessecació de les mostres a l'estufa a 105°C fins a pes constant (ISO R-1442). Es va representar gràficament el contingut en humitat en equilibri de les mostres (g d'aigua per 100 g de matèria seca) en funció de cada activitat de l'aigua a 20°C per a l'adsorció i la desorció. La isoterma d'adsorció es va ajustar a una funció sigmoïdal obtinguda mitjançant regressió no lineal utilitzant el paquet SigmaPlot per a Windows 4.01 (SPSS Inc., 1997).

2.2.7.3 Isoterma d'adsorció de la fracció cel·lular deshidratada per atomització segons el model GAB (Guggenheim-Anderson-De Boer)

S'han proposat diversos models matemàtics que permeten calcular el valor d'alguns paràmetres que donen informació referent a les condicions de màxima estabilitat dels aliments durant la seva conservació. Alhora, aquests models permeten expressar, amb major o menor grau d'aproximació, la relació $X = f(a_w)$, per a cada aliment, essent X el contingut en humitat. A efectes pràctics, és important trobar una expressió matemàtica que ajusti els resultats obtinguts experimentalment amb bona precisió.

La majoria dels models proposats, ja siguin empírics, semi-empírics o teòrics, poden reproduir les dades de la humitat en equilibri, malgrat que cap d'ells permet donar resultats precisos en tot l'interval d' a_w i pels diferents tipus d'aliments. Aquest fet es deu a varies causes, entre les quals podem destacar les següents:

- les isoterms d'equilibri representen les propietats higroscòpiques integrades de nombrosos constituents presents a l'aliment, de manera que la disminució de l' a_w es deu a una combinació de fenòmens, cadascun dels quals pot predominar en un determinat interval d' a_w (Karel, 1973).
- els tractaments tecnològics aplicats als aliments durant la seva elaboració poden modificar i alterar les propietats de sorció dels seus components.
- els aliments, en adsorbir aigua, experimenten canvis en la seva estructura, constitució, etc.

Entre els diferents models teòrics proposats, cal destacar-ne dos dels més utilitzats: el model de Brunauer, Emmett i Teller (BET) i el de Guggenheim, Anderson i De Boer (GAB), ambdós basats en la sorció de la humitat a l'aliment en forma de multicapes.

A partir de les dades experimentals obtingudes, ajustant els valors d' a_w i el percentatge d'humitat (g d'aigua per 100 g d'extracte sec), vàrem determinar la isoterma d'adsorció de la FC en pols segons el model GAB (Castillo *et al.* 1997; Jouppila i Roos, 1994; Kaminski i Al-Bezweni, 1994; Roos, 1993; Singh i Singh, 1996). Aquesta equació proporciona un ajustament més precís i acurat que el model BET per a un ampli ventall de productes amb diferents continguts en humitat (Jouppila i Roos, 1994; Toledo, 1991). La forma de l'equació utilitzada és la següent:

$$m = \frac{M_m C_G k a_w}{(1 - k a_w)(1 - k a_w + C_G k a_w)} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

El model GAB és una equació amb tres paràmetres, on k , C_G i M_m són constants; m és el contingut en humitat de la mostra (grams d'aigua per 100 grams de matèria seca); M_m és el contingut en humitat (sobre extracte sec) equivalent a la capa monomolecular d'aigua adsorbida (monocapa); C_G és la constant de Guggenheim i k és un tercer paràmetre de correcció de les propietats de les molècules d'aigua de la muticapa respecte al bulb líquid, que millora l'ajustament per a un ampli rang de continguts en humitat. L'estimació de les constants M_m , C_G i k del model GAB es va obtenir transformant l'equació 2.1 en la seva forma quadràtica (Caden, 1988). D'aquesta manera, s'obté una equació polinòmica de segon grau com la següent:

$$a_w / m = a a_w^2 + b a_w + g \quad (\text{Eq. 2.2})$$

$$\begin{aligned} \text{on, } a &= (k / M_m) [1 / C_G - 1] \\ b &= 1 / M_m (1 - 2 / C_G) \\ g &= 1 / M_m C_G k \end{aligned}$$

Els coeficients a , b i g de l'equació 2.2 es van determinar a partir de les dades experimentals d'adsorció obtingudes gravimètricament, representant a_w/m respecte l' a_w del producte (Kaminski i Al-Bezweni, 1994). Per determinar el contingut en aigua de la capa monomolecular (M_m) es va aplicar l'equació 2.1 (Toledo, 1991).

2.2.8 Tractament estadístic de les dades

La representació gràfica dels resultats del treball es van dur a terme mitjançant el full de càlcul de Microsoft Excel 97. Els intervals de confiança de les mitjanes es van calcular utilitzant la desviació estàndard de la població ($P=95\%$). Per realitzar les anàlisis de la variància (ANOVA) es va utilitzar el paquet JMP versió 2.0 (1989-91) del SAS Institute, Inc. per a Machintosh. Es varen considerar com a significatius els valors de probabilitat inferiors a 0,05. Per a la comparació de mitjanes es va aplicar el test de Tukey-Kramer

HDS amb un nivell de significació de $P=95\%$. Les dades que presentaven un valor de $P<0,5$ a partir del test de Barlett es van transformar. Es van utilitzar les dades log-transformades dels recomptes microbiològics, dels percentatges d'humitat i dels valors de la variació d'entalpia de transició del procés de desnaturalització proteica. Les dades de solubilitat proteica es van transformar segons la expressió: $\arcsin [(\% \text{ Solubil.}/100)^{1/2}]$.

2.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

2.4.1 Determinació de les condicions del procés de deshidratació per atomització de la fracció cel·lular de la sang de porc

En aquest apartat s'exposen els resultats dels experiments realitzats per estudiar la influència de la temperatura utilitzada per deshidratar per atomització la FC hemolitzada de la sang de porc sobre el contingut en humitat i la funcionalitat de la proteïna, tenint en compte la solubilitat proteica i el grau de desnaturalització produït pel tractament tecnològic, a fi i efecte de determinar les millors condicions de deshidratació per atomització de la FC.

2.4.1.1 Contingut en humitat en funció de la temperatura de deshidratació

La conservació dels productes deshidratats està basada en l'eliminació del 90-95 % de l'aigua que contenen, fet que comporta una disminució de l'activitat de l'aigua (a_w). La baixa disponibilitat d'aigua és el paràmetre que determina la bona conservació durant el període d'emmagatzematge a temperatura ambient dels aliments dessecats, ja que limita el desenvolupament dels microorganismes i evita que es produeixin les reaccions enzimàtiques i químiques de deteriorament.

A la Figura 2.6 es mostren els percentatges d'humitat de la fracció cel·lular (FC) en pols en funció de la temperatura aplicada en el procés de deshidratació per atomització. Com es pot observar, el grau de deshidratació assolit depèn de la temperatura de l'aire utilitzada durant el procés d'atomització. En augmentar la temperatura de deshidratació, es produeix una disminució del contingut en aigua de la FC en pols, és a dir, incrementa el grau de deshidratació.

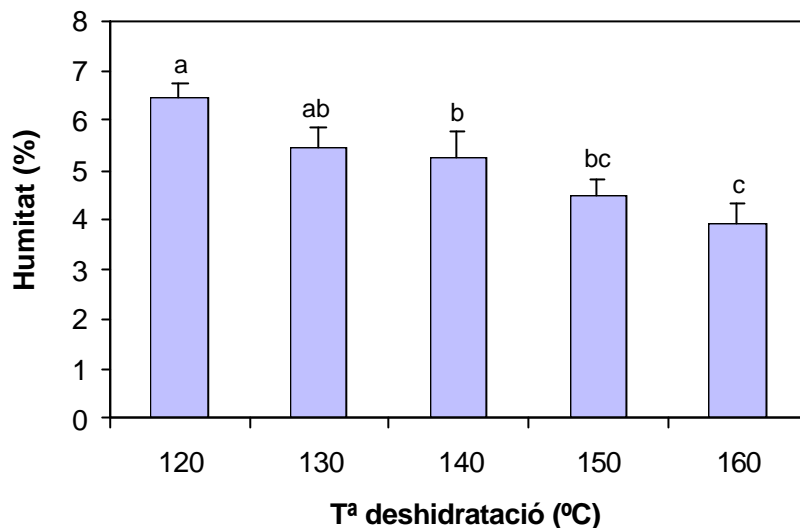


Figura 2.6: Percentatge d'humitat de la FC deshidratada (g d'aigua per 100 g de pols) en funció de la temperatura de deshidratació. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Els tractaments amb lletres diferents són diferents significativament ($P<0,05$).

S'observa una clara relació inversa entre el contingut en aigua i la temperatura de deshidratació, i a partir dels resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) es va veure que existien diferències significatives ($P<0,05$) pel que fa al grau de deshidratació assolit en funció de la temperatura de deshidratació per atomització (dins l'interval de temperatura de 120 a 160°C). Tanmateix, el test de separació de mitjanes (Tukey-Kramer HSD) ens va permetre separar tres grups significativament diferents, els quals es corresponen a les mostres de FC deshidratades a 120°C; 140°C i 160°C. Entre les deshidratacions realitzades a temperatures d'entre 130 i 150°C no existeixen diferències significatives, mentre que aquestes temperatures sí que tenien un efecte significativament superior que si es deshidratava a 120°C i inferior que quan es deshidratava a 160°C.

En general, els aliments deshidratats presenten un contingut en humitat d'entre el 2 i el 10 %, en funció del contingut en aigua inicial i del procediment utilitzat per a deshidratar-los. La FC fresca hemolitzada té un contingut en humitat del $65,9 \pm 0,6$ %, després de la deshidratació per atomització, s'obté un producte en pols amb un percentatge d'humitat que va des d'aproximadament el 6,4 %, quan es deshidrata a 120°C, fins a un 3,9 %, en el cas d'utilitzar una temperatura de l'aire de 160°C. Aquests valors d'humitat estan per sota del 7 % que recomana Ranken (1980) com a valor màxim per als productes deshidratats de la sang.

Així doncs, la tecnologia de deshidratació per atomització és un bon sistema per a conservar el nostre producte, doncs permet eliminar aproximadament el 92 % de l'aigua de constitució de la FC hemolitzada de la sang de porc. A més, aquests percentatges

d'humitat del producte en pols es tradueixen en valors d' a_w suficientment baixos, entre 0,15 i 0,3 (veure apartat 2.4.3 de les isoterms de sorció), que garanteixen l'estabilitat del producte des del punt de vista bioquímic i microbiològic. Tanmateix, donat que els aliments deshidratats són productes altament higroscòpics, per evitar les possibilitats de rehidratació i assegurar la seva estabilitat durant el període d'emmagatzematge, s'hauran d'utilitzar envasos o recipients estancs i impermeables al vapor d'aigua.

2.4.1.2 Influència de la temperatura de deshidratació sobre la solubilitat proteica

La propietat funcional més interessant de les proteïnes és la solubilitat en aigua o dispersabilitat. Donat que els aliments són sistemes hidratats, el comportament físico-químic i reològic dels constituents dels aliments depèn de l'estat d'hidratació d'aquests components (Dill i Landmann, 1988). Les propietats d'hidratació de les proteïnes, en concret la solubilitat, són essencials per a l'activitat funcional òptima d'una proteïna en una solució, suspensió o dispersió i, per tant, determinen la utilització o la incorporació d'una proteïna en un producte alimentari. La solubilitat de les proteïnes és molt influent quan es vol impartir "cos" o consistència a solucions aquoses, i en la formació i l'estabilitat d'escumes i emulsions (Pomeranz, 1991). Però, segons Ranken (1980), encara que moltes de les propietats funcionals depenen de la solubilitat, aquest paràmetre no és suficientment precís per descriure el comportament funcional d'una proteïna, doncs la solubilitat pot estar més o menys influenciada pel pH, temperatura, tipus de dissolvent i per la presència d'altres substàncies en el producte, particularment de la concentració de sals.

Si estudiem l'efecte d'un tractament tecnològic sobre la solubilitat proteica d'un producte podem conèixer quin efecte produeix aquest tractament sobre les propietats funcionals de les seves proteïnes i, en definitiva, com es veu modificada la funcionalitat global del producte a causa de la desnaturalització proteica. La desnaturalització es defineix com la modificació de l'estructura secundària, terciària i/o quaternària de les molècules proteiques, que no comporta el trencament dels enllaços peptídics covalents implicats en l'estructura primària; per tant, el valor nutritiu no es veu modificat. Aquests canvis en l'estructura proteica sovint estan associats amb canvis de les propietats físico-químiques i funcionals.

És molt freqüent que la desnaturalització proteica produeixi d'un descens en la solubilitat a causa de l'aparició de grups hidròfobs a la molècula, a l'agregació de molècules proteiques desplegadas o a un augment de la capacitat d'absorció d'aigua per la proteïna. Cal dir que la determinació del grau d'insolubilització d'una proteïna és, probablement, la mesura més pràctica per estudiar l'efecte d'un procés tecnològic sobre el nivell de desnaturalització o agregació proteica, perquè les proteïnes que es troben en un estat

desnaturalitzat, o parcialment agregat, mostren una disminució de la seva capacitat de gelificació, emulsionant o de formació d'escumes (Cheftel *et al.*, 1989).

L'estat "natiu" és el terme que s'utilitza per descriure la conformació tridimensional d'una proteïna en el seu ambient natural o sota condicions similars a les existents a la natura (per exemple: de temperatura, pH, força iònica, etc.); mentre que l'estat "desnaturalitzat" o "desplegat" es refereix a qualsevol desviació significativa de l'estructura nativa que afecta a la funció biològica. Aquesta desnaturalització pot ser reversible o irreversible, depenent de les condicions ambientals i de les interaccions inter i intramoleculares de la molècula proteica desplegada (Dickinson i McClements, 1996).

La solubilitat de la majoria de les proteïnes es redueix de forma irreversible durant l'escalfament; fins i tot els tractaments tèrmics més suaus poden provocar cert grau de desnaturalització i insolubilitat. En molts dels processos de conservació dels aliments, s'intenta modificar al mínim la funcionalitat dels seus components. En concret, en la deshidratació per atomització es produeix una dessecació molt ràpida del producte sense que aquest pateixi un increment significatiu de temperatura; es considera que les partícules assoleixen com a màxim la temperatura de sortida de l'aire després de l'atomització i, en el nostre cas, aquesta oscil·la entre 55 i 75°C, depenent de la temperatura d'entrada de l'aire utilitzada en la deshidratació.

A la Figura 2.7 es pot observar la influència de la temperatura utilitzada en la deshidratació per atomització sobre la solubilitat proteica de la FC de la sang. A mesura que augmenta la temperatura, el percentatge de proteïna soluble respecte el percentatge de proteïna total, és a dir, la solubilitat o dispersabilitat de la proteïna de la FC a pH 7,5 (pH de la FC deshidratada reconstituïda), disminueix. Així, les mostres deshidratades a 120°C tenen un percentatge de solubilitat del 98 %, mentre que en les deshidratades a 160°C, la solubilitat és aproximadament del 90 %. Aquesta reducció és més acusada de 140 a 150°C, doncs la solubilitat pateix una disminució del 96 % al 92 %, de manera que a partir de 150°C la funcionalitat de l'Hb disminueix de forma més intensa.

Els resultats de l'ANOVA van mostrar que existien diferències significatives ($P < 0,05$) entre les diferents condicions de temperatura de deshidratació pel que fa a la solubilitat proteica. El test de separació de mitjanes va permetre separar dos grups clarament diferenciats; per una banda, les mostres deshidratades amb temperatures d'entre 120 i 140°C i, per l'altra, les que s'havien deshidratat a 150 i 160°C.

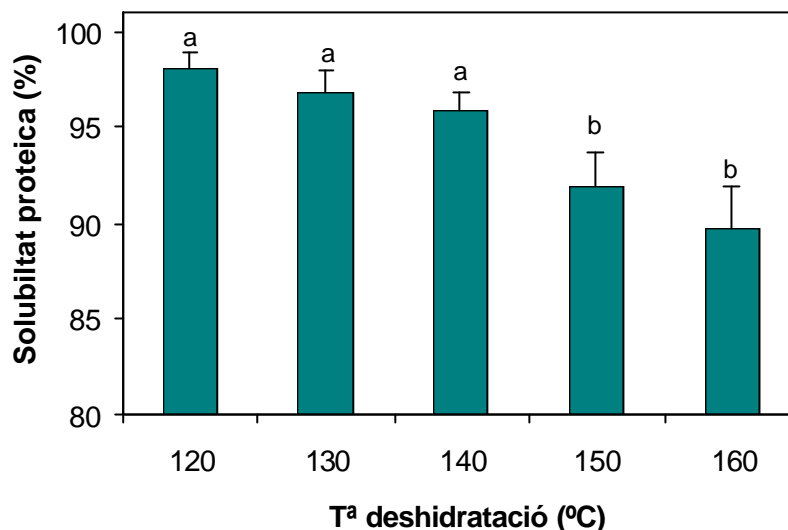


Figura 2.7: Solubilitat proteica (%) a pH 7,5 de la FC en pols en funció de la temperatura de deshidratació. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Els tractaments amb lletres diferents són diferents significativament ($P<0,05$).

Els resultats dels assaigs realitzats per determinar la influència de la temperatura de deshidratació sobre la solubilitat de la FC indiquen que el tractament de deshidratació per atomització no modifica gaire les propietats funcionals de l'Hb, sempre que no es deshidrati a temperatures superiors a 140°C, doncs la solubilitat es manté bastant intacte; per contra, quan la FC es deshidrata a temperatures superiors a 150°C la solubilitat del producte en pols és significativament inferior, ja que el tractament tecnològic produeix una desnaturalització més intensa de la proteïna.

També s'ha tenir en compte que l'eliminació de l'aigua produeix una forta agregació proteica en els productes deshidratats perquè es produeixen interaccions proteïna-proteïna, fonamentalment quan s'utilitzen temperatures elevades per aconseguir l'energia necessària per a l'eliminació de l'aigua, fet que pot provocar una disminució significativa de la solubilitat i de les altres propietats funcionals. Aquest efecte però es redueix en els processos de deshidratació per atomització i encara més en la liofilització (Cheftel, 1989).

2.4.1.3 Anàlisi calorimètrica de la fracció cel·lular per DSC

A la Figura 2.8 podem observar els termogrames obtinguts per anàlisi calorimètrica diferencial (DSC) de la FC fresca i de mostres de FC hemolitzades i deshidratades per atomització amb diferents temperatures de l'aire (120, 130, 140, 150 i 160°C), en els quals es representa el flux de calor (mW) subministrat a la mostra necessari per aconseguir l'equilibri tèrmic entre aquesta i la referència, en funció de la temperatura aplicada.

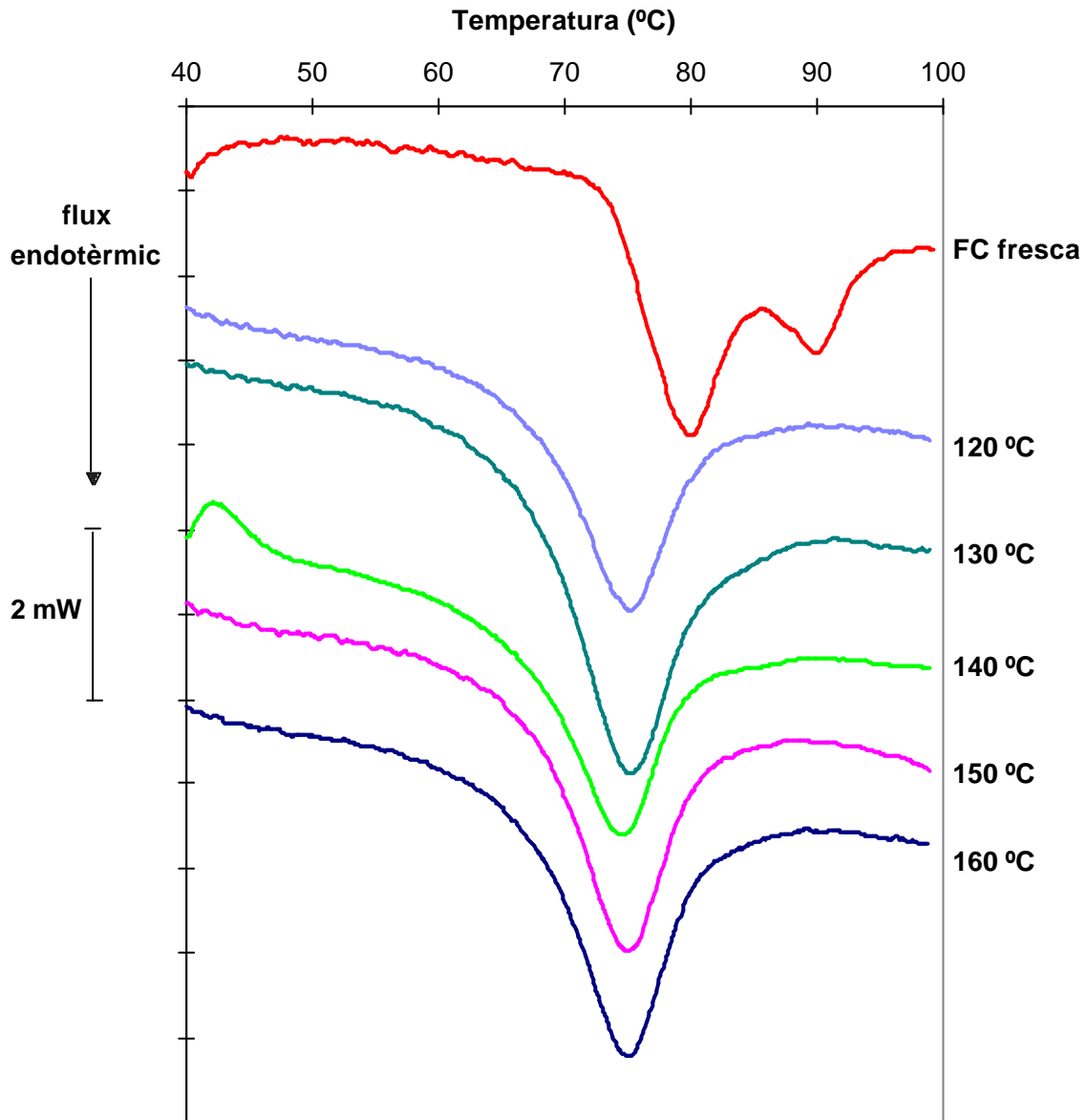


Figura 2.8: Termogrames obtinguts per DSC de mostres de 100 μL de FC fresca de sang de porc i de FC en pols (reconstituïdes al mateix extracte sec que la fresca) deshidratades per atomització a diferents temperatures. Velocitat d'escalfament: $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.

Si comparem la forma i la magnitud dels termogrames de la FC fresca hemolitzada amb els de la FC deshidratada per atomització a diferents temperatures, es pot observar que els termogrames de la FC fresca hemolitzada presenten un pic endotèrmic doble. El primer, de més magnitud, presenta el mínim a 80°C mentre que en el pic menor, el mínim s'observa cap als 90°C . Per contra, en els pics dels termogrames de les diferents mostres de FC deshidratades per atomització no s'observa aquest desdoblament, només presenten un sol pic endotèrmic al voltant dels 75°C .

Aquestes diferències observades en els termogrames, podrien explicar-se pel fet que el tractament de deshidratació per atomització ha produït la desnaturalització de l'Hb, o que s'han produït algunes modificacions de l'estructura nativa de l'Hb, sense arribar a desnaturalitzar-la completament però que afecten a l'estabilitat tèrmica de la proteïna.

Per altra banda, s'ha de tenir en compte que l'estructura quaternària de l'Hb canvia notablement amb l'oxigenació. L'oxihemoglobina ($O_2 \text{ Hb-Fe}^{2+}$) i la desoxihemoglobina (Hb-Fe^{2+}) difereixen clarament en la seva estructura quaternària: la primera presenta una estructura que s'anomena R (relaxada) mentre que la desoxiHb presenta una estructura T (tensa) a causa de la presència d'enllaços salins (interaccions electrostàtiques) que subjecten el tetràmer. L'oxigenació produeix un moviment de l'àtom de ferro del grup hemo que es tradueix en una alteració estructural en la subunitat; aquest canvi es transmet a les interfases entre les subunitats α i β , ocasionant una ruptura dels enllaços salins intercatenaris de la forma T i aquesta passa a forma R. De fet, la unió de IO_2 al ferro del grup hemo arrossega la histidina proximal de la globina i aquest canvi conformacional es transmet a regions de la molècula molt allunyades (Stryer, 1995).

En condicions fisiològiques normals, a la sang coexisteixen les dues formes de l'Hb (oxiHb i desoxiHb). En la FC fresca, com en la sang, també poden coexistir les formes oxiHb i desoxiHb (o ferroHb) i per aquest motiu observem un desdoblament del pic dels termogrames de les mostres de FC fresca: un primer pic de més magnitud i més desplaçat cap a l'esquerra, que es correspondria a la forma desoxiHb, i el segon pic més petit que reflexaria la forma oxigenada. En canvi, a la FC deshidratada, s'observava un sol pic més estret i encara més desplaçat cap a l'esquerra. L'explicació podria ser que la deshidratació per atomització produeix una oxidació del ferro del grup hemo i, per tant, la proteïna es troba majoritàriament en forma de metaHb (o ferriHb), en la qual el ferro està en forma Fe^{3+} i no es combina amb l' O_2 . Un altre fet que consolidaria aquesta hipòtesi són els termogrames obtinguts a partir del patró d'Hb de sang de porc, que eren molt petits i apareixien fins i tot molt abans que els de les nostres mostres en pols. Aquest patró es tracta d'Hb dialitzada i liofilitzada i pot ser que la proteïna estigui força oxidada i en conseqüència totalment en forma de metaHb.

L'afinitat de l'Hb per l' O_2 està influenciada pel pH; així, a pH àcid l'afinitat per l' O_2 disminueix. És per això que als teixits metabòlicament actius com per exemple el múscul, l'elevada concentració de CO_2 i d'ions H^+ promouen l'alliberació de l' O_2 de l'oxiHb als teixits, mentre que a pH bàsic l'Hb té una gran afinitat per l' O_2 i aquesta allibera els H^+ i el CO_2 (als capil·lars dels alvèols pulmonars). Aquest comportament de l'Hb en funció del pH es coneix com l'efecte Bohr (Stryer, 1995).

En base a que el pH pot influenciar l'estat de l'Hb, vàrem considerar si la deshidratació per atomització produïa modificacions del pH a la FC i, d'aquesta manera, podríem explicar les diferències observades en l'estudi calorimètric.

En el plasma sanguini, Parés (1998) va observar que la deshidratació conduïa a una alcalinització del producte (des de valors de pH de 7,4 en el plasma líquid fins a valors de pH de 9,2-9,3 en la pols reconstituïda), degut fonamentalment a que l'eliminació de l'aigua comporta la pèrdua de la capacitat tamponant de la sang que proporciona el sistema carbònic-carbonat ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \ll \text{H}_2\text{CO}_3 \ll \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). No obstant, la FC en pols (reconstituïda al mateix extracte sec que la fresca) presenta un pH al voltant de $7,5 \pm 0,1$, com el de la FC fresca i, en principi, hauríem de descartar aquesta possibilitat.

A partir dels termogrames obtinguts per DSC, es van determinar la temperatura de desnaturalització proteica (T_d), considerada com la temperatura en la que es produeix el mínim del pic endotèrmic, i la variació d'Entalpia de transició del procés de desnaturalització (DH), calculada a partir de l'àrea sota el pic de transició, que proporciona una estimació de l'energia tèrmica que es requereix per desnaturalitzar la proteïna. Aquests paràmetres calorimètrics permeten distingir les propietats tèrmiques de les diferents mostres estudiades i avaluar l'estabilitat de l'Hb enfront la intensitat del tractament tecnològic d'una forma més objectiva, de forma que, si s'observa una disminució d'aquests paràmetres en les mostres en pols respecte al valor d'aquests abans de la deshidratació, podem treure informació sobre el grau de desnaturalització produït per la deshidratació.

A la Taula 2.3 es comparen les temperatures de desnaturalització proteica (T_d) i els valors de la variació d'Entalpia de transició del procés de desnaturalització (DH) de mostres de FC en pols deshidratades per atomització a diferents temperatures. També es comparen amb els valors obtinguts en la FC fresca hemolitzada (abans de la deshidratació) i amb els d'un patró comercial d'Hb de sang de porc liofilitzada.

El patró comercial d'Hb de sang de porc presenta uns valors de variació d'Entalpia i de temperatura del procés de desnaturalització proteica molt inferiors a les nostres mostres, ja sigui la FC abans de la deshidratació o les mostres en pols. Aquest fet possiblement ve determinat perquè el procediment d'obtenció i purificació d'aquest patró produeix modificacions estructurals en la proteïna nativa i, per tant, determina una desnaturalització més intensa de la proteïna. Això fa descartar la utilització d'aquest patró d'Hb com a referència. Per aquest motiu, es va prendre la FC fresca i hemolitzada com a referència de l'estat natiu de la proteïna abans del tractament tecnològic de deshidratació per atomització.

Si es comparen els valors de la temperatura de desnaturalització i els de la DH , que reflexa la calor absorbida durant la desnaturalització, de les diferents mostres de FC en pols amb els de la FC fresca, es pot observar que el procés de deshidratació per atomització produeix una lleugera desnaturalització de l'Hb. De forma general, s'observa que totes les mostres deshidratades per atomització presenten menor estabilitat tèrmica que les de FC fresca, doncs els valors dels dos paràmetres calorimètrics investigats a les

diferents mostres de FC deshidratades per atomització són inferiors que els observats a la mostra fresca. L'ANOVA va demostrar que existien diferències significatives ($P < 0,05$) entre les mostres de FC fresca hemolitzada i les de FC deshidratades pel que fa a la variació de l'Entalpia, així com a la temperatura en la qual es produeix la desnaturalització o el desplegament de l'Hb.

Taula 2.3: Propietats tèrmiques de la FC fresca, de la FC en pols en funció de la temperatura de deshidratació per atomització i d'un patró d'Hb de sang de porc obtingudes per DSC ⁽¹⁾. Les determinacions es varen fer a una velocitat d'escalfament de $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Les lletres diferents indiquen els grups que són significativament diferents ($P < 0,05$).

mostra	Td ($^{\circ}\text{C}$) ⁽²⁾		DH ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$) ⁽³⁾
patró d'hemoglobina	71,10 \pm 1,77		1,7 \pm 0,41
FC fresca	79,86 \pm 0,16 ^a (pic 1)	90,12 \pm 1,9 (pic 2)	5,72 \pm 0,67 ^a
FC pols (120 $^{\circ}\text{C}$)	75,04 \pm 0,32 ^b	-	4,45 \pm 0,42 ^b
FC pols (130 $^{\circ}\text{C}$)	74,73 \pm 0,87 ^b	-	4,70 \pm 0,52 ^b
FC pols (140 $^{\circ}\text{C}$)	74,81 \pm 0,85 ^b	-	4,64 \pm 0,42 ^b
FC pols (150 $^{\circ}\text{C}$)	74,20 \pm 0,86 ^b	-	4,45 \pm 0,21 ^b
FC pols (160 $^{\circ}\text{C}$)	74,15 \pm 0,61 ^b	-	4,53 \pm 0,36 ^b

⁽¹⁾ Mitjanes de les determinacions fetes com a mínim per triplicat sobre cada mostra (mitjana \pm desviació estàndard).

⁽²⁾ Temperatura de desnaturalització proteica (pic endotèrmic).

⁽³⁾ Entalpia de transició del procés de desnaturalització proteica ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$ de mostra).

D'altra banda, si observem la influència de la temperatura a la qual es deshidrata la FC sobre els paràmetres calorimètrics DH i Td de les mostres en pols, sembla que la intensitat de desnaturalització proteica és proporcional a la temperatura utilitzada en el procés de deshidratació per atomització doncs, encara que els valors de la variació de l'Entalpia de transició són força semblants i no s'aprecien gaires diferències, la temperatura de desnaturalització proteica tendeix a disminuir lleugerament a mesura que s'incrementa la temperatura a la qual s'han deshidratat les mostres. Aquest fet indica que un increment de la temperatura utilitzada en la deshidratació produeix una disminució de l'estabilitat tèrmica de la proteïna de la FC i, per tant, una major desnaturalització proteica. La disminució del valor de la Td és bastant progressiva, però de 140 a 150 $^{\circ}\text{C}$ es produeix de forma més marcada. Aquest fet coincideix amb la disminució més acusada de la solubilitat de l'Hb, ja que en aquest interval de temperatura de treball es produeix una reducció més intensa d'aquesta propietat funcional. Tanmateix, l'ANOVA va posar de manifest que no existien diferències significatives ($P > 0,05$) per l'efecte de la temperatura

aplicada en el procés de deshidratació sobre les propietats tèrmiques estudiades (Td i *DH*) entre les diferents mostres de la FC en pols.

2.4.1.4 Discussió global de la determinació de les condicions de deshidratació de la fracció cel·lular per atomització

En base als resultats obtinguts en l'estudi de la influència de la temperatura utilitzada en la deshidratació per atomització sobre el grau de deshidratació, la solubilitat proteica i l'estabilitat tèrmica de les mostres en pols, es va escollir 140°C com la temperatura òptima per deshidratar la FC de la sang de porc per atomització. Aquesta temperatura no produeix gaires modificacions de la funcionalitat de la proteïna, com ho indiquen els valors de la seva solubilitat, doncs és significativament semblant a la de les mostres deshidratades a temperatures inferiors (120 i 130°C); tanmateix, a 140°C el grau de deshidratació assolit és superior.

Els estudis de l'estabilitat tèrmica de l'Hb per DSC en funció de la temperatura de deshidratació, indiquen que a 140°C s'ha produït certa desnaturalització, però l'estat de la proteïna és força semblant al de les mostres deshidratades a temperatures inferiors. En definitiva, 140°C és la temperatura òptima de l'aire per deshidratar per atomització la FC de la sang de porc, sense que el tractament tecnològic aplicat produeixi modificacions importants de l'estructura de l'Hb i, per tant, sense comprometre gaire la seva funcionalitat, doncs la solubilitat es manté al voltant del 95,5 %. Al mateix temps, la deshidratació a 140°C permet disminuir el contingut en humitat del producte fins a valors del 5 %, que en principi garanteixen un grau de deshidratació segurament suficient per a l'estabilitat microbiològica i bioquímica del producte durant el període de conservació. Tanmateix, aquest aspecte es tornarà a discutir més endavant, en l'apartat de les isoterms de sorció de la FC deshidratada per atomització, mitjançant les quals es relacionarà el contingut en humitat amb l'activitat de l'aigua del producte, donat que la disponibilitat de l'aigua (a_w) del producte deshidratat és realment el paràmetre que determinarà la conservació del producte des del punt de vista microbiològic, químic i enzimàtic.

2.4.2 Caracterització microbiològica de la fracció cel·lular

A l'interior de l'organisme dels animals sans la sang és estèril. Tanmateix, durant el procés de dessagnat, recollida i processament a l'escorxador, aquesta es pot contaminar per microorganismes provinents de l'aire, pell, femtes, orina i regurgitacions del contingut digestiu (Swingler, 1982).

Les mostres de sang utilitzades en el present estudi provenien d'un escorxador que utilitza un sistema de recollida obert. Encara que aquesta es refrigeri immediatament després de la seva obtenció i s'emmagatzemi en condicions de refrigeració fins al seu processament al laboratori, el sistema de recollida no evita que la sang pugui entrar en contacte amb els diversos contaminants citats anteriorment, fet que es reflecteix en l'elevada contaminació microbiològica que presenta la primera matèria i, en conseqüència, els diferents productes obtinguts després del seu processament.

2.4.2.1 Recompte de microorganismes aerobis mesòfils viables

Els microorganismes aerobis mesòfils són els que presenten una temperatura òptima de creixement entre 30 i 37°C i que es desenvolupen en presència d'oxigen. El recompte total d'aquests microorganismes és el paràmetre més utilitzat per conèixer la contaminació microbiològica general que presenta un producte alimentari. Dóna informació sobre la qualitat sanitària dels productes analitzats i reflexa les condicions higièniques de la primera matèria, les condicions de manipulació durant l'elaboració i l'emmagatzematge, i l'estat d'alteració dels aliments. De manera que, en general, els recomptes totals baixos en un aliment són indicadors d'una manipulació higiènica o d'un emmagatzematge adequat del mateix.

Malgrat això, és important tenir present que els recomptes de la microbiota aeròbia mesòfila estima la microbiota total sense especificar el tipus de microorganisme. Tenen, per tant, un valor limitat. Per exemple, un recompte total baix no sempre reflecteix un bon estat sanitari, doncs encara que l'aliment presenti poca contaminació general, pot presentar microorganismes patògens. També és possible que l'aliment contingui toxines que es mantenen estables, encara que els microorganismes productors d'aquestes no resisteixin les condicions del medi i, per tant, no siguin detectats. Un recompte total elevat tampoc significa, inevitablement, la presència de patògens.

Els resultats dels recomptes de microorganismes aerobis mesòfils viables de la FC fresca, la FC hemolitzada per ultrasons i centrifugada, i la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C es mostren a la Figura 2.9.

A partir dels resultats de l'ANOVA, es va veure que existien diferències significatives ($P < 0,05$) entre els 3 tipus de mostres de FC (fresca, hemolitzada per ultrasonicació i hemolitzada i deshidratada per atomització) pel que fa als recomptes de microorganismes aerobis mesòfils. Malgrat tot, el test de separació de mitjanes va diferenciar clarament dos grups: d'una banda, la FC fresca i la FC hemolitzada, amb recomptes de l'ordre de 10^6 ufc·mL⁻¹ en els dos tipus de mostres i, per altra banda, la FC en pols (reconstituïda al mateix extracte sec que la FC hemolitzada), amb recomptes de l'ordre de 10^5 ufc·mL⁻¹.

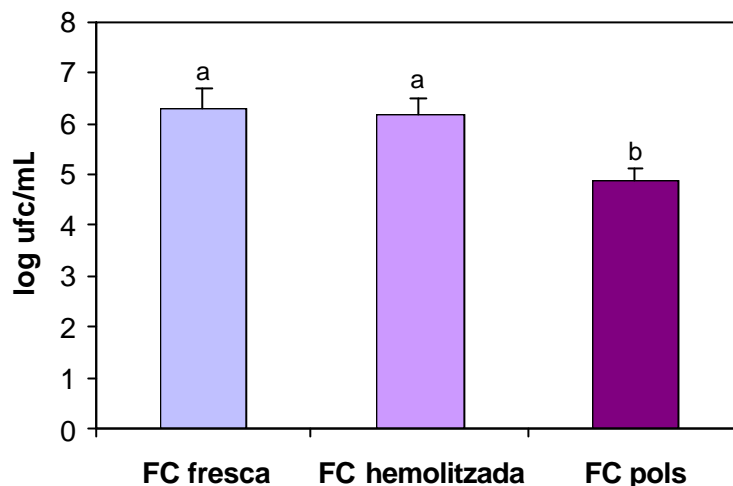


Figura 2.9: Recompte de microorganismes aerobis mesòfils de la FC fresca, FC hemolitzada per ultrasons i FC hemolitzada i deshidratada per atomització (reconstituïda al mateix extracte sec que la FC fresca). Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents mostren els grups que són significativament diferents ($P<0,05$).

a) Recomptes totals de la fracció cel·lular fresca

Els resultats de les anàlisis realitzades en la caracterització microbiològica de la FC fresca de la sang de porc reflecteixen una elevada contaminació d'aquesta, amb recomptes de microorganismes aerobis mesòfils viables de l'ordre de 10^6 ufc·mL⁻¹. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en altres estudis realitzats amb la sang sencera (Ockerman i Hansen, 1994; Parés, 1995), en els quals s'exposava que la càrrega contaminant de la sang és de l'ordre de 10^5 a 10^6 ufc·mL⁻¹.

El fet pel qual els nivells de contaminació general de la FC fresca coincideixin amb els de la sang sencera es pot explicar per l'efecte que produeix la centrifugació durant el procés de fraccionament de la sang per separar la fracció corpuscular de la fracció plasmàtica. Ockerman i Hansen (1994) expliquen que, després de centrifugar la sang, aproximadament el 20-25 % dels microorganismes queden en el plasma, i el 75-80 % restant a la fracció corpuscular.

Donat que el procés de centrifugació de la sang pot produir certa separació dels microorganismes, aquests tendrien a romandre en la fase més densa (FC). Per contra, la fracció plasmàtica, de menor densitat, presentaria una menor contaminació, malgrat que sempre reflecteixi l'elevada contaminació de la sang. Parés (1995) va trobar que la centrifugació de la sang produïa una disminució d'un ordre de magnitud en el plasma, doncs els recomptes totals en aquesta fracció eren de l'ordre de 10^4 a 10^5 ufc·mL⁻¹. Aquesta elevada contaminació de la primera matèria ve determinada pel sistema de

recollida de sang que utilitza l'escorxador del qual provenien les mostres de sang, amb el qual, com s'ha comentat anteriorment, les possibilitats de contaminació són força elevades.

Per millorar la recollida de la sang i evitar aquesta contaminació, s'han desenvolupat sistemes tancats que incorporen la utilització d'un ganivet balmat, a través del qual la sang flueix des del torrent sanguini cap a un dipòsit estèril, sense entrar en contacte amb les fonts potencials de contaminació. Quan la sang és obtinguda de forma higiènica mitjançant sistemes tancats, els recomptes totals poden arribar a ser de l'ordre de 10^3 ufc·mL⁻¹ (Lynn Knipe, 1988; Ockerman i Hansen, 1994). Una altra alternativa per controlar la càrrega microbiològica del producte és la de sotmetre'l a algun procediment tecnològic de descontaminació o higienització abans de la seva deshidratació, sempre i quan la tecnologia aplicada no produeixi modificacions de la funcionalitat i de les característiques organolèptiques del producte.

b) Efecte de l'hemòlisi per ultrasons i la centrifugació sobre els recomptes totals

La FC hemolitzada presenta uns recomptes totals de microorganismes aerobis mesòfils lleugerament inferiors als de la FC fresca, abans del tractament d'hemòlisi amb ultrasons i la posterior centrifugació. Malgrat això, no existeixen diferències significatives entre els dos tipus de mostres. A partir d'aquests resultats, podem veure que, tot i que els ultrasons s'utilitzen com a sistema de conservació no tèrmica dels aliments per la seva capacitat d'inactivació o destrucció dels microorganismes, atribuïda als fenòmens de cavitació intracel·lular induïts pels ultrasons (Hoover, 2000; Pascual *et al.*, 1997; Pohlman *et al.*, 1997), en el nostre cas, la ultrasonicació no ha produït una reducció significativa dels recomptes totals. Això pot ser degut a que la intensitat o el temps de tractament aplicats han estat suficients per produir l'hemòlisi dels eritròcits però no per a poder destruir els microorganismes contaminants. Per aconseguir un efecte de descontaminació o higienització de la primera matèria, caldria l'aplicació de tractaments amb ultrasons d'elevada intensitat, els quals poden donar lloc a modificacions físico-químiques i organolèptiques indesitjables del producte. Segons Hoover (2000), els factors crítics que determinen l'eficàcia dels ultrasons són el temps d'exposició dels microorganismes a les ones ultrasòniques, el tipus de microorganisme, el volum i la composició de l'aliment, i la temperatura de tractament.

Per altra banda, el procés de centrifugació a 20900 x g durant 30 min, aplicada a la FC després dels ultrasons per separar la solució d'Hb de l'estroma (pellet), tampoc ha produït una disminució significativa dels recomptes totals de la FC fresca. La bactofugació és un procés molt utilitzat a la indústria làctia, que permet sedimentar els bacteris en suspensió en la llet mitjançant l'aplicació d'una força centrífuga de l'ordre de 12000 x g, gràcies a la diferència de densitat entre les cèl·lules i el medi líquid on es troben. A escala industrial, aquest tractament s'aplica en condicions de temperatura d'entre 55 i 75°C, ja que permet

disminuir la viscositat de la llet i afavorir la separació dels microorganismes. En el cas de la fracció cel·lular, aquesta es centrifugava a temperatura ambient (15-20°C), donat que un augment de la temperatura altera irreversiblement la funcionalitat del producte i produeix una coagulació proteica. Parés (1998) va observar reduccions d'entre 1,5 i 2 unitats logarítmiques de la contaminació microbiològica del plasma, treballant a temperatura ambient i sota una força centrífuga de 21000 x g. La poca eficàcia de separació dels microorganismes contaminats de la FC hemolitzada mitjançant el procés de centrifugació es pot atribuir a l'elevada viscositat d'aquesta a temperatura ambient respecte a la del plasma o d'altres productes.

c) Efecte de la deshidratació per atomització sobre els recomptes totals

S'ha observat que el tractament de deshidratació per atomització sí que produeix una disminució de la càrrega microbiològica contaminant, doncs els recomptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC en pols (reconstituïda al mateix extracte sec que la FC fresca) són significativament inferiors als de la FC fresca i als de la hemolitzada; concretament es produeix una reducció de l'ordre d'una unitat logarítmica.

És força comú que els tractaments de deshidratació produeixin una disminució de la contaminació general dels aliments. A més, en els productes deshidratats, durant el període d'emmagatzematge i a causa de la baixa activitat de l'aigua, es produeix una disminució progressiva de la població microbiana inicial (Frazier i Westhoff, 1988). Tanmateix, el producte deshidratat reflecteix l'elevada contaminació de la primera matèria, ja que presenta uns recomptes totals propers a 10^5 ufc·mL⁻¹, nivells que segueixen essent massa elevats si aquest producte es vol utilitzar com a additiu alimentari.

2.4.2.2 Investigació i recompte de *Staphylococcus aureus*

El gènere *Staphylococcus* pertany a la família *Micrococcaceae*. Són cocs gram-positius, catalasa positius, aerobis i anaerobis facultatius, no esporulats i immòbils. *S. aureus* és l'espècie més important des del punt de vista sanitari, doncs algunes soques són responsables d'una intoxicació alimentària produïda per una enterotoxina que causa gastroenteritis i que cursa amb vòmits i diarrees. La majoria de les soques enterotoxigèniques són coagulasa i DNAsa positives, però no tots els estàfils coagulasa-positius són necessàriament enterotoxigènics. *S. aureus* és un dels microorganismes més resistents a activitats d'aigua baixes i es poden desenvolupar fins a valors d' a_w de 0,83 a 0,86, encara que per sintetitzar l'enterotoxina requereix una a_w de 0,89 (Troller, 1989).

L'hàbitat normal de *S. aureus* és la pell, mucoses i les foses nasals de l'home i els animals. Roberts (1982) descriu les possibles rutes de contaminació del teixit muscular

carni: per transferència directa des de la superfície de la canal cap a la carcassa mitjançant els ganivets o altres estris de treball; indirectament per contacte amb l'equipament o l'ambient contaminat en operacions prèvies; i per les mans o la roba dels manipuladors, ja que l'home és el principal reservori per a la transmissió del patogen als aliments durant el seu processament. Quan un aliment presenta un elevat nombre d'estafilococs, en general, significa que el control de la temperatura d'emmagatzematge, els tractaments de neteja i desinfecció, i la manipulació del mateix no han estat adequats. En el nostre producte, la presència d'aquest microorganisme vindrà determinada per la via directa de contaminació de la sang amb la pell de l'animal durant el procés de dessagnat.

A la Figura 2.10 es pot observar l'efecte de la deshidratació per atomització sobre els recomptes de *S. aureus* de la FC hemolitzada per ultrasonicació.

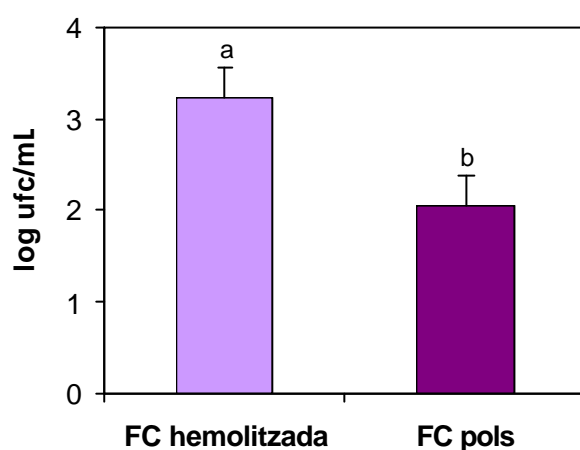


Figura 2.10: Recomptes de *S. aureus* de la FC hemolitzada i de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització (reconstituïda al mateix extracte sec que la FC fresca). Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents mostren els grups que són significativament diferents ($P<0,05$).

Els resultats de l'ANOVA van mostrar que existien diferències significatives ($P<0,05$) entre els recomptes de *S. aureus* de la primera matèria (la FC hemolitzada), de l'ordre de 10^3 ufc·mL⁻¹, i el producte deshidratat reconstituït, que presenta uns recomptes inferiors a 10^2 ufc·mL⁻¹, essent 10^2 el llindar de detecció que permet la tècnica. El test de separació de mitjanes va posar de manifest que els dos grups eren significativament diferents. Per tant, la deshidratació per atomització produeix una disminució significativa dels estafilococs presents a la FC hemolitzada de la sang de porc.

Aquesta disminució pot ser deguda a que aquest microorganisme és bastant termosensible i no ha resistit les condicions de deshidratació. Tanmateix, les

enterotoxines que produeix *S. aureus* són molt resistents als tractaments tèrmics i poden suportar les elevades temperatures del procés de deshidratació. Des del punt de vista higiènic-sanitari, la FC deshidratada presenta uns recomptes de *S. aureus* inferiors a 10^2 ufc·g⁻¹ de pols, que la farien apta per al consum humà. Malgrat això, cal considerar que aquest valor és una mitjana i, entre les mostres estudiades, algunes presentaven recomptes de 10^2 i 10^3 ufc·g⁻¹, fet que s'ha de tenir en compte si aquest subproducte es vol utilitzar com a ingredient alimentari, ja que la presència d'aquest microorganisme significa que no s'han pres les suficients mesures higièniques en el procés de recollida i manipulació de la sang. A més, pot ser que el microorganisme no hi sigui present, mentre que les toxines produïdes per aquest, donat que són més resistents, poden romandre en l'aliment, de manera que l'addició de la FC en altres productes alimentaris podria suposar un risc potencial d'intoxicació alimentària. De fet, Parés (dades no publicades), en un estudi realitzat sobre plasma deshidratat de la sang de porc, va trobar presència de toxines de *S. aureus* en algunes de les mostres estudiades.

2.4.2.3 Investigació i recompte de Clostridis sulfít reductors

Quan es troben microorganismes esporulats en els aliments refrigerats o en els deshidratats, existeix el risc de la presència de clostridis sulfít-reductors, com *C. perfringens* i *C. botulinum*. Aquests microorganismes són bacils gram positius, esporulats, anaerobis estrictes, mesòfils i que redueixen els sulfits a sulfurs. En general, aquest grup de microorganismes s'utilitza com a indicadors de contaminació fecal, doncs alguns clostridis formen part de la flora intestinal normal de l'home i els animals, com el *C. perfringens*, que es sol trobar al sòl, pols, femtes humanes i d'animals, carn crua, pollastre i aliments deshidratats. Els *C. perfringens* tipus A, C i D són patògens per a l'home, produeixen unes enterotoxines que causen diverses malalties entèriques.

Donat que els clostridis formen part de la flora intestinal de l'home i els animals, existeix la possibilitat que *C. botulinum* hi sigui present. Quan es desenvolupa als aliments, produeix una toxina responsable del botulisme, intoxicació alimentària caracteritzada per un síndrome neurològic, paràlisi musculars, alteracions abdominals i sovint associada a un índex de mortalitat elevat. Malgrat que les toxines són termolàbils (s'inactiva amb un tractament a 80°C durant 10 minuts o equivalent), les espores de *C. botulinum* són molt termoresistents i algunes soques són proteolítiques i putrefactives.

Els resultats de l'estudi de l'efecte de la deshidratació per atomització sobre els recomptes de clostridis sulfít reductors a la FC de la sang de porc hemolitzada es mostren a la Figura 2.11. La deshidratació per atomització produeix una disminució significativa ($P < 0,05$) dels recomptes de clostridis sulfít-reductors a la FC. El test de separació de mitjanes també va diferenciar clarament els dos grups: la FC hemolitzada, amb recomptes de clostridis de l'ordre de 10^2 ufc·mL⁻¹, i la FC deshidratada (reconstituïda al

mateix extracte sec que la FC hemolitzada), amb recomptes inferiors a 10^1 ufc·mL⁻¹, essent 10^1 el llindar de detecció de la tècnica. Tanmateix, malgrat que la majoria de les mostres de FC deshidratades per atomització presenten nivells de contaminació per clostridis inferiors al nivell de detecció de la tècnica, en 3 de les 10 mostres de pols estudiades es van trobar recomptes de l'ordre de 10^1 ufc·g⁻¹. Des del punt de vista sanitari es recomana l'absència d'aquest grup de microorganismes en un aliment; per aquest motiu, aquesta FC deshidratada s'hauria de considerar no apta per a ús alimentari.

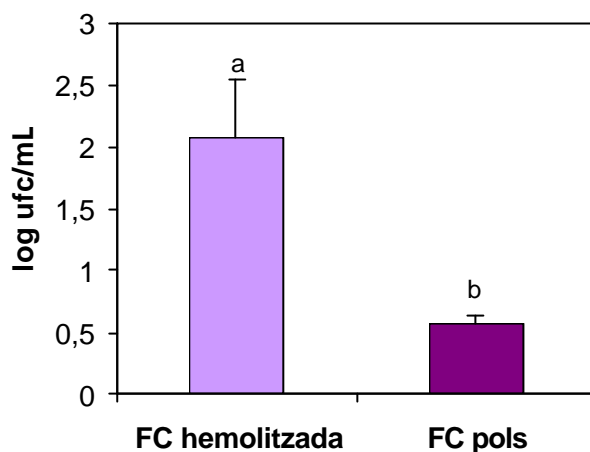


Figura 2.11: Recomptes de clostridis sulfit reductors de la FC hemolitzada i de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització (reconstituïda al mateix extracte sec que la FC fresca). Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents mostren els grups que són significativament diferents ($P<0,05$).

2.4.2.4 Discussió global de la caracterització microbiològica de la FC en pols

Els resultats de la caracterització microbiològica de la FC demostren que el tractament amb ultrasons aplicat per hemolitzar la FC prèviament a la deshidratació, i la centrifugació posterior, no ha disminuït de forma significativa la microbiota contaminat total del producte, almenys a les condicions estudiades; per contra, els recomptes de bacteris aerobis mesòfils sí que disminueixen significativament després del procés de deshidratació per atomització.

Tanmateix, aquesta FC deshidratada per atomització no seria apta per utilitzar-la com a ingredient per al consum humà. El nostre producte, malgrat que presenti una activitat de l'aigua baixa, obstacle que té un efecte protector enfront el possible deteriorament bioquímic i microbiològic, és susceptible de presentar formes esporulades de clostridis o d'altres espècies de microorganismes resistents a les condicions de dessecació, com per exemple *S. aureus* o, si més no, les seves toxines. Per tant, en principi, es pot assegurar

l'estabilitat del producte durant l'emmagatzematge enfront el possible deteriorament, però no es pot garantir la seva qualitat higiènic-sanitària quan aquest es reconstitueixi.

És important considerar el potencial contaminant del nostre producte, sobretot si pensem en el fet que quan la fracció cel·lular s'addicionarà en un producte alimentari, conjuntament amb altres ingredients, cadascun dels components aportarà la seva pròpia microbiota contaminant, que encara que sigui baixa, en el producte final pot arribar a suposar un risc per a la salut o per a l'estabilitat del producte. Per poder utilitzar aquest subproducte s'haurien de millorar les condicions de recollida a l'escorxador, aplicant una sèrie de mesures encaminades a reduir el risc de contaminació, o bé sotmetre la sang o la fracció cel·lular fresca a algun tractament tecnològic de descontaminació o d'higienització, prèviament al procés de conservació mitjançant la deshidratació per atomització, per evitar o reduir l'elevada contaminació microbiològica de la primera matèria i millorar la seva qualitat higiènic-sanitària.

2.4.3 Caracterització físico-química de la fracció cel·lular hemolitzada i deshidratada per atomització

En aquest apartat s'exposen els resultats de la caracterització físico-química del nostre producte acabat, concretament en base a les característiques de la seva composició química i als components del color de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C.

2.4.3.1 Composició química de la fracció cel·lular en pols

La fracció cel·lular de la sang de porc abans de la deshidratació té una concentració de proteïna del 37,2 % (96,6 % sobre l'extracte sec), un contingut d'aigua del 61,5 % i un percentatge de greix del 0,26 % (Parés, 1995). Aquests valors són força propers als trobats a la bibliografia. Ockerman i Hansen (1994) va trobar un 1 % de lípids i entre un 1 i un 3 % de sals minerals, mentre que Ranken (1980) cita un 1,1 % de sals minerals i un 0,4 % de greixos. Cal considerar que existeixen diferències en la composició d'aquesta fracció de la sang entre espècies i fins i tot entre individus de la mateixa espècie.

A la Taula 2.4 es presenten els resultats de les anàlisis físico-químiques de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C per determinar la seva composició. Com es pot observar, presenta una composició bastant constant doncs les desviacions estàndards són força estretes. El contingut en proteïna representa aproximadament entre el 94 i el 95 % del producte deshidratat i majoritàriament es correspon a l'Hb. Aquest component és el que presenta més variabilitat entre mostres, mentre que en els altres components el marge de variabilitat és força estret. Malgrat tot, cal considerar que aquesta variabilitat es deu a la precisió de la tècnica analítica.

Taula 2.4: Composició química de la fracció cel·lular en pols. ^a

Component	Percentatge (% en pes) ^b
HUMITAT	5,27 ± 0,77
PROTEÏNA	94,57 ± 1,09
CENDRES	3,03 ± 0,25
GREIX	0,70 ± 0,24

^a Mitjanes de les determinacions fetes com a mínim per duplicat sobre cada mostra (mitjana ± DS, n=10).

^b en g per 100 g de FC en pols.

Si comparem les dades del nostre producte amb la composició de la globina dessecada estudiada per Ockerman i Hansen (1994), el percentatge de proteïna és molt semblant i el contingut en sals minerals (3 %) es troba dins de l'interval citat per aquests autors i força proper al 2,3 % trobat per Lynn Knipe (1988). La variabilitat observada en el percentatge de sals minerals ve determinada per la concentració d'anticoagulant afegida a la sang durant el procés de recollida, ja sigui perquè s'utilitzen sistemes de dosificació poc precisos o per la variabilitat en la dosificació en funció de l'escorxador, que en el cas de citrat sòdic pot variar del 0,4 al 0,8 % (p/v) (Parés, 1995).

En canvi, el nostre producte té un major contingut en humitat que la globina dessecada segons Ockerman i Hansen (1994) que presenta una humitat del 3,5 % i també és lleugerament superior al 4,5 % d'humitat de la fracció cel·lular deshidratada segons Lynn Knipe (1988); aquestes petites diferències són degudes a les condicions de deshidratació d'aquests productes. En el nostre cas, no hem arribat a un grau de deshidratació tan intens perquè per determinar les millors condicions d'aplicació del procés tecnològic, a part del contingut en humitat final del producte en pols, hem tingut en compte el manteniment de la funcionalitat de la proteïna.

També hem trobat un contingut en greix superior que els percentatges que es citen a la bibliografia. El nostre producte presenta quasi un 1 % de greix, concretament un 0,7 %, valor relativament superior al 0,1 % trobat per Lynn Knipe (1988). Malgrat tot, no podem comparar els nostres resultats amb els citats per aquest autor donat que desconeixem l'espècie de la qual procedia la sang i el tipus de tractament aplicat a la fracció corpuscular dessecada.

2.4.3.2 Caracterització dels paràmetres del color de la fracció cel·lular en pols

Com tots els pigments d'estructura tetrapirròlica, l'Hb presenta unes determinades propietats espectrals i colorants, degudes fonamentalment a l'estat del grup hemo. L'estat d'oxidació del ferro del grup hemo (Fe^{2+} o Fe^{3+}) i la naturalesa dels grups que estan units a la sisena posició d'aquest (O_2 , NO, CO_2 , H^+) expliquen l'origen de les variacions de color i la reactivitat de l'hemoglobina. El ferro és un metall de transició que disposa d'orbitals buits o incomplets, de manera que la transició d'electrons a aquests orbitals determina l'absorció de la llum en l'espectre visible i, en conseqüència, el color de l'Hb i dels seus derivats.

Les modificacions de l'Hb produïdes pels tractaments tecnològics condicionen el color d'aquesta quan s'addiciona als productes carnis. Les principals formes de l'Hb són la desoxiHb, l'oxiHb i la metaHb. La desoxiHb és el pigment natural, té un àtom de ferro en estat ferrós (Fe^{2+}) en el grup hemo. Aquest derivat té un color vermell-porpre i està present quan la pressió parcial d'oxigen és baixa. En presència d'oxigen (atmosfera normal), l'Hb es transforma a oxiHb. Aquest pigment, de color vermell intens, és un complex $\text{Hb-Fe}^{2+}\text{-O}_2$, relativament estable quan la pressió parcial d'oxigen és elevada. La metahemoglobina (MHb) és una forma oxidada de l'Hb, en la qual el ferro del grup hemo es troba en estat fèrric (Fe^{3+}). Es tracta d'un pigment marronós fosc, generalment indesitjable en els productes carnis. Per això s'han proposat diferents procediments de descoloració de la fracció cel·lular, per poder utilitzar la globina com a additiu alimentari.

El poder colorant de l'Hb és poc estable i durant els processos tecnològics o l'emmagatzematge es poden produir canvis en el seu color que es tradueixen en canvis en les coordenades cromàtiques o paràmetres de color (Potter i Hotchkiss, 1995). La desnaturalització de la globina pels tractaments tèrmics o per pHs baixos afavoreix l'autooxidació de l'Hb a metaHb (Cheftel *et al.*, 1989) i aquesta és la responsable de l'aparició d'un color marronós fosc no desitjat. Aquest enfosquiment s'observa quan deshidratem el nostre producte per atomització. Segurament, en la fracció cel·lular en pols el pigment està majoritàriament en forma de metaHb perquè el tractament tecnològic ha produït una oxidació del ferro del grup hemo.

El grup hemo de l'Hb presenta dues bandes d'absorció en l'espectre visible. Una d'elles és poc intensa i presenta un màxim d'absorció entre 550 i 660 nm, és la *banda Q* característica del color vermell del pigment i la seva longitud d'ona d'absorció màxima varia en funció de l'estat de l'hemo (oxiHb o metaHb). La segona banda d'absorció, la *banda B o de Soret*, és més intensa i presenta un màxim d'absorció a 430 nm (Cheftel *et al.*, 1989).

Els resultats de les determinacions dels paràmetres CIE L^* , a^* i b^* del color de les diferents mostres de fracció cel·lular hemolitzada deshidratada per atomització a 140°C

es mostren a la Taula 2.5. Els valors de les tres coordenades cromàtiques (Lluminositat, To i Saturació) són bastant constants en les diferents mostres estudiades i reflecteixen el color vermell marronós fosc del producte en pols obtingut.

Taula 2.5: Valors dels components CIE L* a* b* del color i la Saturació (C*) de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C.

Components primaris del color	Mitjanes \pm SD ^a
Valor L* (Lluminositat)	32,03 \pm 0,67
Valor a* (To vermell-verd)	+21,91 \pm 1,47
Valor b* (To groc-blau)	+14,62 \pm 1,05
Valor C* (Saturació) ^b	26,35 \pm 1,67

^a Mitjanes de les determinacions fetes com a mínim per triplicat sobre cada mostra (mitjana \pm DS, n=10).

^b Cromacitat = $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$.

El valor de la coordenada vermell-verd (a*) és força elevat com a conseqüència de la intensa pigmentació vermella que presenta el nostre producte. En molts productes carnis s'ha observat que aquest paràmetre s'incrementa en funció de la concentració dels hemopigments presents. Per exemple, algunes vísceres com el pulmó presenten valors del component vermell elevats (+a*) ja que contenen gran quantitat de sang retinguda i, per tant, una alta concentració d'Hb; en el cor, donat que presenta una major proporció de mioglobina que altres teixits musculars, els valors de la coordenada a* són superiors que els de la carn magra (Pérez-Álvarez *et al.*, 1998).

El nostre producte també presenta certa tonalitat groguenca, tal com reflecteix el paràmetre b* (+). La Saturació o Cromacitat (C*), que representa la intensitat o la tonalitat del color resultant de la combinació entre els components a* i b*, està més propera a les tonalitats griseses que als colors vívids de l'espectre. La lluminositat (L*) és relativament baixa, degut bàsicament a que l'oxidació de l'Hb es tradueix en un enfosquiment o disminució del component L* del color de la fracció cel·lular en pols.

2.4.4 Activitat de l'aigua i isoterms de sorció de la fracció cel·lular deshidratada per atomització

L'aigua és el constituent principal de quasi tots els aliments en estat natural i té un paper essencial en la seva estructura i textura. La interacció de l'aigua amb els constituents químics dels aliments és el principal factor responsable del comportament de l'aliment

davant els processos de deteriorament i determina la seva relativa estabilitat durant l'emmagatzematge. Donat que la possibilitat que en un aliment es produeixi el desenvolupament dels microorganismes o les reaccions deteriorants en les que intervé l'aigua, depèn de la disponibilitat d'aquesta al producte més que del seu contingut total en aigua, per expressar la susceptibilitat dels aliments a les diferents reaccions químiques i bioquímiques de deteriorament, s'utilitza un paràmetre termodinàmic, l'activitat de l'aigua (a_w), que indica la disponibilitat de l'aigua en un aliment.

L'activitat de l'aigua és una " propietat fonamental de les solucions aquoses " de gran interès sanitari i tecnològic, ja que condiciona les possibilitats de conservació dels productes alimentaris. Està acceptat de forma generalitzada que l'activitat de l'aigua està més estretament relacionada amb les propietats físico-químiques i biològiques dels aliments i d'altres productes naturals, que el contingut total d'humitat (Rockland i Nishi, 1980). L' a_w es defineix com la relació entre la pressió de vapor que exerceix l'aigua d'un aliment a la interfase sòlid-gas (P_w) i la pressió de vapor de l'aigua pura (P_{w_0}), mesurades totes dues a la mateixa temperatura (Scott, 1957; citat per Troller, 1989):

$$a_w = \frac{P_w}{P_{w_0}}$$

L' a_w és l'equilibri entre la humitat relativa de l'aliment i el medi ambient que l'envolta. Així doncs, l' a_w i la humitat relativa en l'equilibri (HRE) es relacionen amb la fórmula següent:

$$a_w = \frac{\% \text{ HRE}}{100}$$

de manera que l' a_w és un terme anàleg a la humitat relativa però expressat com a tant per 1. Per definició, l' a_w de l'aigua pura és 1,0. L' a_w dels aliments va des de valors al voltant de zero, per als aliments deshidratats, fins a valors propers a la unitat, en els quals l'aigua està totalment disponible, com a les fruites i hortalisses fresques, la carn, el peix i la llet (Taula 2.6).

El moviment de l'aigua entre l'aliment i el seu ambient està governat per l' a_w . Quan l' a_w de l'aliment sigui superior a la de l'ambient, es produirà una deshidratació del producte alimentari, passant l'aigua lliure a l'aire que l'envolta; aquesta pèrdua d'aigua s'aturarà quan les a_w de l'aliment i de l'aire s'equilibrin. En el cas contrari, quan l' a_w de l'aliment sigui inferior, aquest adsorbirà aigua de l'ambient. Existeixen diferents paràmetres que influeixen l' a_w dels aliments: temperatura, composició, propietats físiques, força iònica i pH de l'aliment.

Taula 2.6: Valors d'activitat de l'aigua segons els aliments.

a_w	Aliments
0,98 - 1,00	Fruites i hortalisses fresques, carn, peix, llet i formatges frescos.
0,93 - 0,96	Carns curades, la majoria de formatges.
0,86 - 0,93	Formatges curats secs i productes carnis curats fermentats.
0,80 - 0,87	Farina, pastissos, arròs, cereals, llet condensada ensucrada.
0,72 - 0,88	Productes d'humitat intermitja, melmelades i confitures.
0,60 - 0,66	Fruits secs.
0,20 - 0,60	Aliments deshidratats.

Font: Lewis (1990).

a) Temperatura

Per a un mateix sòlid, i a humitat relativa constant, l' a_w augmenta quan incrementa la temperatura. En augmentar la temperatura, els enllaços que existeixen dins de l'aliment es trenquen, i així fan incrementar l' a_w . És per aquest fet que la conservació en refrigeració allarga la vida útil dels aliments, ja que es disminueix l' a_w de la mateixa manera que les temperatures de refrigeració també dificulten les possibles reaccions físico-químiques deteriorants i el desenvolupament microbià.

b) Composició de l'aliment

Segons els ingredients presents als aliments, aquests tenen diferent capacitat de lligar l'aigua als seus punts actius (grups -OH, $-NH_3^+$, $-COO^-$, etc.) i, per tant, varia la quantitat d'aigua lliure o disponible. Per exemple, a la regió de baixes HR, els aliments rics en midó, com els cereals, farines, patates, hortalisses, etc., presenten la màxima capacitat de retenció d'aigua. En canvi, els aliments rics en proteïnes, com la fracció cel·lular i altres productes carnis, lactis, ous i peixos, tenen una capacitat de retenció d'aigua inferior que els amilacis, però superior a la de les fruites (Vidal *et al.* 1986) i a la dels productes amb elevat contingut en cel·luloses (Christian, 1983-1984).

c) Propietats físiques de l'aliment

L'estat físic en el qual es troba l'aliment, segons tingui una estructura amorfa o cristal·lina, influeix de forma acusada sobre la capacitat de retenció de l'aigua. Aquest estat físic depèn, en gran part, dels tractaments tecnològics aplicats. Els processos de deshidratació, liofilització, congelació, etc., produeixen variacions en l'absorció de l'aigua. Per exemple, l'escalfament del midó produeix una modificació de la seva estructura, perquè en la gelatinització, la xarxa cristal·lina impermeable a l'aigua, es transforma en un estat amorf. La grandària de les partícules de l'aliment també influeix l' a_w , ja que l'adsorció d'aigua depèn de la superfície que tingui la partícula, i aquesta superfície està

relacionada amb la grandària de la partícula. Així, com més petites siguin les partícules, més aigua lligaran, fent disminuir l' a_w .

d) Força iònica

En funció de la concentració d'ions que existeixi en el medi, aquests, en solvatar-se, lligaran més o menys quantitat d'aigua. Així, quan augmentem la força iònica dels aliments, per exemple en els processos de salat, l' a_w disminuirà.

e) pH

Segons el pH, variarà l'estat d'ionització dels grups iònics de l'aliment, així com la seva capacitat de lligar aigua i, per tant, aquesta estarà més o menys disponible.

Influència de l' a_w en la qualitat i l'estabilitat dels aliments:

L' a_w dels aliments té una influència directa sobre canvis específics que es poden produir en el color, aroma, textura, *flavour*, estabilitat bioquímica i microbiològica, i en l'acceptabilitat dels productes alimentaris frescos o processats (Rockland i Nishi, 1980). El desenvolupament dels microorganismes en els aliments depèn clarament de diversos paràmetres com la disponibilitat de l'aigua, contingut i concentració de nutrients, pH, temperatura, potencial d'oxidació-reducció, presència o absència de certes substàncies, etc. Així, l'activitat de l'aigua d'un aliment determina el possible creixement de microorganismes patògens i/o deteriorants. En general, una disminució de l' a_w suposa un augment de la fase de latència de la corba de creixement dels microorganismes, de manera que disminueix la seva velocitat de creixement. Els valors mínims d' a_w per al desenvolupament i la producció de toxines d'alguns microorganismes patògens d'origen alimentari es poden veure a la Taula 2.7.

Taula 2.7: Efecte de l' a_w sobre el creixement i la producció de toxines de diferents espècies de microorganismes patògens en aliments. Font: Troller (1989).

Microorganisme	a_w mínima	
	Creixement	Producció de toxines
<i>Salmonella</i> spp.	0,94	—
<i>Clostridium botulinum</i> - tipus A i B	0,93	0,84
<i>Clostridium perfringens</i>	0,95	desconegut
<i>Bacillus cereus</i>	0,93	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	0,89
<i>Listeria monocytogenes</i>	0,93	—
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,94	—
<i>Aspergillus flavus</i>	0,83	0,78

Aquestes dades suggereixen que a nivells d' a_w per sota de 0,78-0,80 no existeix creixement de microorganismes patògens. També indiquen que els fongs filamentosos generalment són més osmòtol-lerants que els bacteris pel que fa a la seva capacitat de desenvolupar-se i de produir toxines a baixes a_w . Està demostrat que el creixement de la majoria dels bacteris és inhibit a a_w inferiors a 0,90 i per a la majoria de fongs filamentosos i llevats entre 0,88 i 0,80 (Troller, 1989). Des del punt de vista microbiològic es poden classificar els aliments en tres categories: aliments d'humitat alta (HMF), l' a_w dels quals varia entre 0,9-1,0; aliments d'humitat intermitja (IMF), amb una a_w entre 0,6-0,9; i aliments de baixa humitat (LMF), amb una a_w entre 0,0-0,6. En el deteriorament de molts HMF, l'acció dels microorganismes és decisiva, mentre que pels IMF només és rellevant l'acció de certs tipus de microorganismes osmòfils o osmòtol-lerants i en els LMF el creixement microbià està pràcticament inhibit (Vidal i Bornhardt, 1991).

Els enzims deteriorants presents als aliments poden ser endògens o bé ser secretats per microorganismes que creixen en l'aliment. L'aigua promou de diverses formes l'activitat enzimàtica: com a mitjà de difusió i desplaçament, solvent dels substrats, reactiu durant la hidròlisi, estabilitzant de l'estructura i configuració dels enzims, font d'hidrogen per formar enllaços entre grups polars o com a medi on s'alliberen els productes de la reacció. A mesura que augmenta l' a_w de l'aliment, la velocitat de les reaccions enzimàtiques s'accelera (Figura 2.12). Aquest increment s'atribueix a un augment en la mobilitat dels enzims. En la regió de la capa monomolecular (aigua fortament lligada) la mobilitat és nul·la i, per tant, l'activitat enzimàtica no és possible (Troller, 1989).

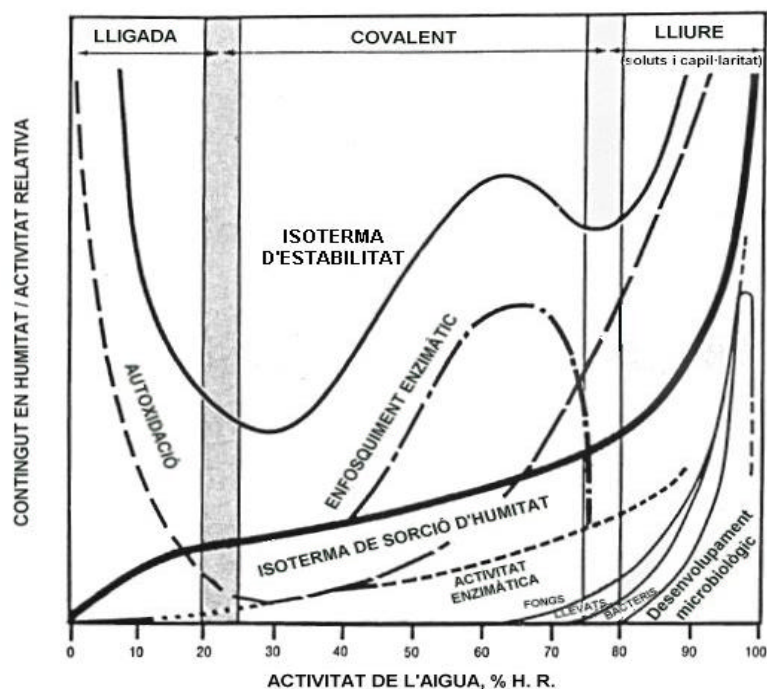


Figura 2.12: Representació de les velocitats relatives d'alteració dels aliments en funció de l' a_w i les propietats de sorció d'humitat dels productes alimentaris (Rockland i Beuchat, 1987).

L'efecte de l' a_w en l'oxidació dels lípids és una mica complex. Les reaccions d'autoxidació dels greixos són les úniques reaccions de deteriorament dels aliments que tenen lloc a qualsevol valor d' a_w , fins i tot a a_w baixes, malgrat que en l'interval d' a_w entre 0,2 i 0,4 es produeixen més lentament. S'ha observat que si s'augmenta la concentració d'aigua fins a valors intermitjos, aquesta té un efecte protector enfront l'oxidació. S'han proposat diverses hipòtesis que expliquen els mecanismes de la disminució de l'oxidació autocatalítica dels lípids per valors d' a_w baixos o l'efecte protector a valors d' a_w elevats (Karel, 1973; Pomeranz, 1991; Troller, 1989).

Les reaccions d'enfosquiment no enzimàtic o reaccions de Maillard es produeixen als aliments com a resultat de processos d'escalfament, deshidratació o concentració, donant lloc fonamentalment a modificacions de les característiques organolèptiques dels aliments, sobretot del color i del *flavour*, però també produeixen una alteració del valor nutritiu ja que els compostos de les reaccions de Maillard provenen d'una sèrie de reaccions hidrolítiques no enzimàtiques entre sucres reductors i aminoàcids. La possibilitat que es produeixin aquestes reaccions depèn directament de l' a_w i presenta el grau màxim entre 0,5 i 0,8 (Figura 2.12). A baixes activitats de l'aigua, el factor limitant és la dificultat de mobilitat, degut fonamentalment a l'augment de viscositat que va assolint el producte a mesura que perd aigua (Troller, 1989); mentre que a a_w altes, l'enfosquiment s'inhibeix per l'efecte de dilució dels substrats de la reacció per la presència de gran quantitat d'aigua lliure (Karel, 1973).

Relació entre l' a_w i el contingut en aigua: Isotermes de sorció

Si es col·loca un aliment higroscòpic en contacte amb una atmosfera d'humitat relativa i temperatura constants, aquest guanyarà o perdrà aigua fins a assolir un contingut d'humitat determinat, anomenat humitat d'equilibri. En aquest moment, la pressió de vapor de l'aigua sobre la superfície de l'aliment (P) serà igual a la pressió parcial del vapor d'aigua a l'ambient que envolta al producte (P_w).

Una isoterma de sorció d'humitat és la corba que indica, en l'equilibri i a una temperatura determinada, la quantitat d'aigua retinguda per un producte en funció de l' a_w , o el que és equivalent, en funció de la humitat relativa de l'atmosfera que envolta l'aliment. Dit d'una altra manera, s'anomena isoterma de sorció d'humitat d'un aliment, a la pressió parcial de vapor que exerceix l'aigua de l'aliment en funció del seu contingut en aigua, en l'equilibri i a una temperatura constant.

Si un aliment higroscòpic es troba en un ambient amb una HR superior a la HRE corresponent al seu contingut en humitat, aquest fixarà vapor d'aigua fins que assoleixi l'equilibri. Aquest fenomen es coneix com adsorció, i les isotermes d'equilibri obtingudes seguint aquest procediment són les isotermes d'adsorció. En el cas contrari, si l'aliment es posa en contacte amb un ambient on la seva HR és inferior a la HRE corresponent al

contingut d'humitat del producte, cedirà vapor d'aigua a l'ambient i es dessecarà, o millor dit, patirà un procés de desorció. En aquest cas s'anomenen isoterms de desorció.

En general, per a un mateix producte i a una temperatura determinada, la isoterma d'adsorció no es superposa a la de desorció (Figura 2.13). Aquesta no coincidència de les dues isoterms s'anomena histèresi i és especialment més pronunciada en la zona intermèdia de les isoterms d'equilibri, que es correspon amb l'aigua lligada de forma dèbil a la capa monomolecular. El fenomen de la histèresi té una gran influència sobre el comportament dels aliments en els processos d'adsorció o de desorció d'aigua. Per a un producte amb el mateix contingut en aigua, s'estableix l'equilibri en la desorció a un valor d' a_w corresponent a una pressió parcial de vapor d'aigua menor que l'adsorció. De manera que, a una mateixa a_w , el contingut en humitat d'un producte en la isoterma d'adsorció, en general, és inferior al de la desorció, especialment en els productes frescos i naturals (Karel, 1973; Rockland i Nishi, 1980).

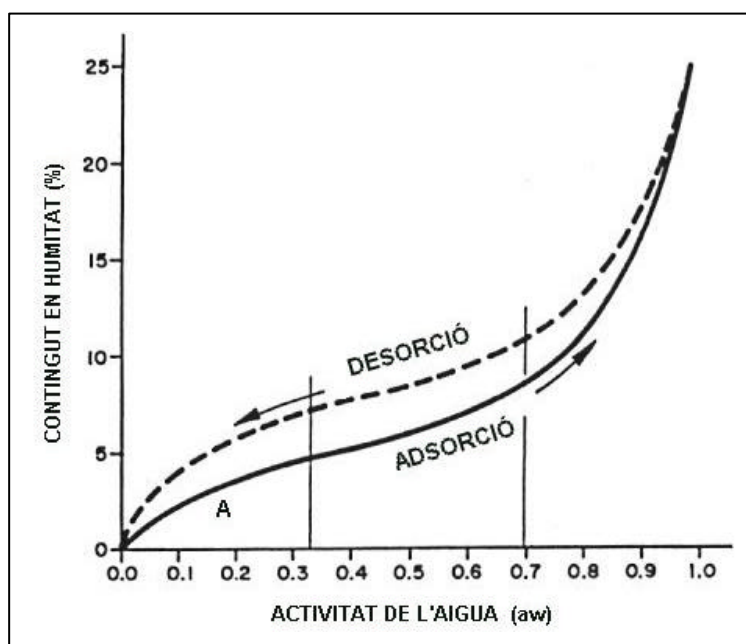


Figura 2.13: Representació esquemàtica de les isoterms de sorció mostrant el fenomen de la histèresi (Kapsalis, 1987).

Les isoterms de sorció dels productes alimentaris poden presentar diferents formes, encara que la més freqüent és la forma sigmoïdal (Jimenez i Arraiz, 1980; Vidal *et al.*, 1986; Wolf *et al.*, 1972). La zona **A** indicada en la Figura 2.13 correspon a l'aigua fortament lligada a l'aliment, en forma de capa monomolecular, fixada als grups polars de certs compostos; i també a l'aigua de cristal·lització de les sals i sucres. Aquesta part de l'aigua no està disponible per actuar com dissolvent o reactiu (Vidal *et al.*, 1986) i tampoc es pot congelar. Per sobre de la zona **A**, les isoterms poden dividir-se en dues o més regions, corresponents a l'aigua cada vegada més disponible i formades per capes

successives d'aigua dèbilment lligada a la monomolecular mitjançant ponts d'hidrogen. Finalment, a valors d' a_w per sobre de 0,75 es troba l'aigua lliure, que representa la major part de l'aigua dels aliments frescs o processats (no els deshidratats), present en dissolucions, retinguda per capil·laritat o per forces de naturalesa osmòtica (Wolf *et al.*, 1972).

Interès tecnològic de les isoterms de sorció

Les isoterms de sorció, que representen la relació funcional entre l' a_w i el contingut en aigua en equilibri d'un aliment, a temperatura i pressió constants, són de gran interès en la tecnologia alimentària, ja que permeten predir entre d'altres: les propietats de lligar aigua dels materials dels aliments; el temps de deshidratació dels productes alimentaris i fer una estimació de l'energia necessària pel procés d'assecamment; les condicions d'equilibri quan es mesclen ingredients amb diferents activitats de l'aigua; l'estabilitat microbiològica i bioquímica en funció del contingut en aigua d'un producte; i el comportament dels aliments durant el període d'emmagatzematge, i per tant, la vida comercial útil dels aliments (Vidal i Bornhardt, 1991). Les condicions d'emmagatzematge o els diferents processos tecnològics que s'apliquen als aliments produeixen canvis significatius en la seva qualitat, que estan associats a canvis en la histèresi de les isoterms de sorció. Així, estudiant els canvis produïts en la histèresi, es pot determinar el deteriorament de la qualitat que ha sofert el producte (Wolf *et al.*, 1972). Per exemple, en la producció d'aliments deshidratats que s'han de rehidratar abans de la seva comercialització, hom pot trobar que el producte presenta una a_w molt superior a l'esperada.

Les isoterms de sorció varien amb la temperatura i, principalment, segons la composició del producte (Banwart, 1982). En un estudi fet amb quatre proteïnes (gelatina, ovoalbúmina, caseïna i queratina) es va observar que les diferents formes que presentaven les corresponents isoterms eren degudes a les diferents estructures proteïques, composició en aminoàcids i altres característiques físico-químiques de les proteïnes, així com a canvis produïts pels tractaments tèrmics aplicats (Hägerdal i Löfqvist, 1973). En un altre estudi fet amb diferents fibres alimentàries, també es va observar la diferent forma que presentaven les isoterms de sorció, deguda principalment a canvis en l'estructura de cada tipus de fibra, que produeixen modificacions en les propietats de lligar o adsorbir aigua (Cadden, 1988).

A la Taula 2.8 es mostren els valors de l'activitat de l'aigua a 20°C de tres mostres de FC (A, B i C) hemolitzades i deshidratades per atomització a 140 °C, obtinguts pel mètode de la interpolació gràfica. A la Taula 2.9 es poden observar les mitjanes de les dades experimentals dels continguts en humitat (g aigua per 100 g de sòlids) de les tres mostres diferents de FC deshidratades per atomització a 140 °C estudiades (A, B i C) en funció de la seva activitat de l'aigua a 20°C.

Taula 2.8: Activitats de l'aigua (a_w) a 20°C de les mostres A, B i C de FC deshidratada per atomització a 140°C determinades pel mètode de la interpolació gràfica, i coeficients de regressió de les rectes.

Mostra	a_w (20°C)	R^2
A	0,2124	0,942
B	0,2123	0,912
C	0,2442	0,901

Taula 2.9: Contingut en humitat en l'equilibri de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C en funció de l' a_w a 20°C.

a_w (20°C)	Contingut en aigua (g aigua/100 g matèria seca) ^a	
	ADSORCIÓ	DESORCIÓ
0,20	5,55 ± 0,38	5,55 ± 0,38
0,336	7,86 ± 0,36	9,95 ± 0,40
0,435	9,79 ± 0,36	10,95 ± 0,10
0,549	11,46 ± 0,42	13,31 ± 0,29
0,656	14,94 ± 0,41	16,18 ± 0,94
0,755	18,95 ± 0,37	21,42 ± 0,92
0,98	62,60 ± 1,64	62,60 ± 1,64

^a Mitjanes ± IC de les dades experimentals obtingudes pel mètode gravimètric, realitzant dues determinacions per a cadascuna de les mostres de FC en pols analitzades (A, B i C).

Les isoterms de sorció a 20°C de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització es mostren a la Figura 2.14. Els valors obtinguts en la determinació gravimètrica de la isoterma d'adsorció de la FC deshidratada per atomització s'han ajustat a una funció sigmoïdal mitjançant regressió no lineal i el coeficient de regressió obtingut és molt elevat ($R^2=0,998$). La representació gràfica de la isoterma de desorció s'ha realitzat de forma aproximada a partir de les dades experimentals donat que no existeix cap model que permeti el seu ajustament.

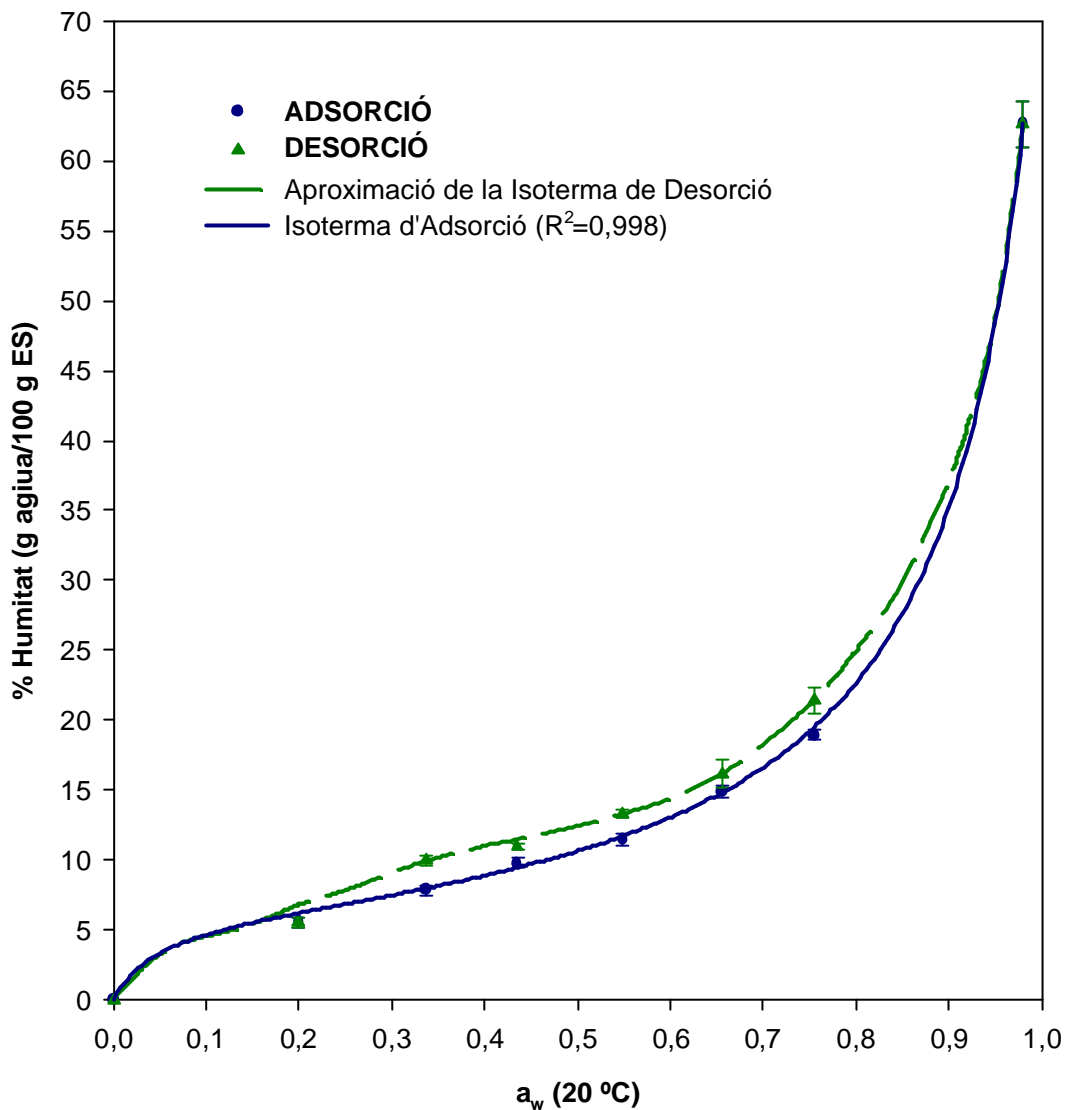


Figura 2.14: Isothermes de sorció a 20°C de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C. La isoterma d'adsorció s'ha ajustat a una funció sigmoïdal mitjançant regressió no lineal. La isoterma de desorció és una aproximació gràfica. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

Les isoterms de sorció a 20°C de la FC deshidratada per atomització presenten una forma sigmoïdal característica dels productes alimentaris, és a dir, una zona inicial convexa, una zona intermèdia força lineal i una zona final còncaua. El contingut en humitat en equilibri de la fracció cel·lular en pols augmenta quan incrementa l'activitat de l'aigua a temperatura constant i disminueix quan disminueix l' a_w , tant en l'adsorció com en la desorció. Aquesta forma sigmoïdal és més accentuada en aliments amb un elevat contingut en proteïnes (Kapsalis, 1981; Wolf *et al.*, 1972) i s'atribueix a diferències qualitatives en l'afinitat per l'aigua dels sòlids higroscòpics (Castillo, 1997).

A les isoterms de la Figura 2.14 es poden diferenciar tres segments en funció de l' a_w , força coincidents amb les regions que normalment s'observen a les isoterms de forma sigmoïdal. Aquestes regions representen els tres principals mecanismes de lligam de l'aigua al producte segons l' a_w d'aquest (Cadden, 1988; Rockland i Nishi, 1980). En primer lloc, fins a valors d' a_w de 0,25, s'observa una zona inicial convexa, corresponent a la regió de la monocapa o d'aigua fortament lligada mitjançant ponts hidrofílics sobre els punts polars dels components de l'aliment. Aquesta part de l'aigua no està disponible per actuar com a dissolvent o reactiu. En la FC deshidratada estaria representada per l'aigua lligada als grups iònics de l'Hb (NH_3^+ i COO^-). La segona regió o zona intermèdia, des de valors d' a_w de 0,25 fins a 0,75, és més aviat lineal i es correspondria amb la regió de la multicapa, una zona de transició en la qual l'aigua està cada cop més dèbilment lligada mitjançant ponts d'hidrogen. En tercer lloc, a partir de nivells d' a_w de 0,75 i fins a 1,0, s'observa la secció final còncava de les isoterms, que es correspondria a la regió d'aigua unida per capil·laritat, condensada sobre la multicapa o aigua lliure, en la qual estan dissolts la major part dels components del sistema, com els aminoàcids lliures o els sucres.

En la regió intermèdia de les isoterms de la FC, aquestes no coincideixen, o el que és el mateix, la isoterma d'adsorció no es superposa a la de desorció. Aquest comportament diferent, que s'observa en forma de bucle a la representació gràfica, es correspon a la histèresi i, en el nostre cas, és força estreta i llarga si la comparem amb la que normalment s'observa a les isoterms dels productes alimentaris. En efecte, a la Figura 2.14 podem observar que a un mateix valor d' a_w , per exemple 0,4, el contingut en aigua del producte en la isoterma de desorció és superior (11 %) que el de la isoterma d'adsorció (9 %). La histèresi comença a valors d' a_w superiors a 0,2 i les dues isoterms no tornen a coincidir fins a valors per sobre de 0,8; aquesta zona es correspon fonamentalment a la regió intermèdia de la isoterma, és a dir, on l'aigua està lligada de forma dèbil a la capa monomolecular.

Segons Wolf *et al.* (1972), la histèresi de les isoterms és una característica molt important per conèixer el comportament dels diferents aliments en els processos de sorció de vapor d'aigua, doncs proporciona informació addicional, de la qual no se'n disposaria si s'estudiessin la isoterma d'adsorció i de desorció de forma aïllada o per separat. La histèresi indica que existeix un mecanisme de protecció natural dels aliments enfront a determinades condicions d'humitat ambiental, com per exemple la pèrdua d'aigua en una atmosfera seca o la humidificació.

Aquest comportament observat en la histèresi de les isoterms de la FC en pols també és característic en molts aliments amb un elevat percentatge de proteïna, com la carn i els llegums (Kapsalis, 1987). Les proteïnes tenen més capacitat de retenció de l'aigua que els lípids o els sucres i això determina que no existeixin tantes diferències entre les isoterms d'adsorció i les de desorció i, per tant, que la histèresi sigui més estreta. El fet

que les isoterms de sorció de la FC en pols presentin una histèresi força estreta també és un fet bastant comú en els productes deshidratats, en els quals el contingut en humitat en la isoterma de desorció és significativament inferior, a la mateixa a_w , que la dels productes frescos o naturals (Rockland i Nishi, 1980).

A partir de les dades experimentals es va calcular la isoterma d'adsorció, ajustant els valors d' a_w i els percentatges d'humitat experimentals segons el model GAB (proposat per Guggenheim-Anderson-de Boer) (Jouppila i Ross, 1994; Kaminski i Al-Bezweni, 1994; Roos, 1993). Els coeficients de regressió i l'equació obtinguts mitjançant l'ajustament de les dades experimentals a una funció polinòmica de segon grau (Figura 2.15) es poden veure a la Taula 2.10. Finalment es va obtenir la isoterma d'adsorció a 20°C de la FC deshidratada per atomització segons el model GAB que es mostra a la Figura 2.16.

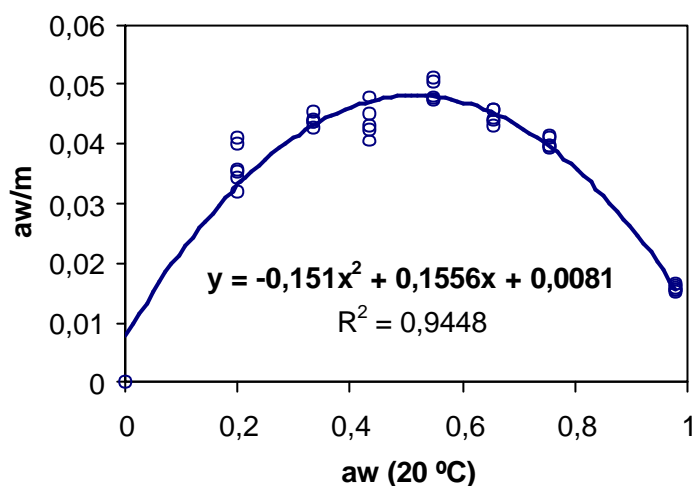


Figura 2.15: Relació entre a_w/m i l' a_w (a 20°C) de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C per calcular els coeficients de regressió α , β i γ (essent m els g d'aigua per 100 g de matèria seca).

La isoterma d'adsorció de la FC deshidratada per atomització, obtinguda segons l'ajustament de les dades de sorció experimentals al model proposat per Guggenheim-Anderson-De Boer (GAB), també presenta una forma sigmoïdal. Sembla que l'equació GAB és un bon model per a les dades obtingudes de forma experimental, doncs la funció polinòmica de segon grau de la Figura 2.15, on es va representar l' a_w en funció de a_w/m (a partir de les dades obtingudes gravimètricament) per determinar els coeficients de regressió a partir dels quals es va aplicar el model GAB, presentava un coeficient de correlació força elevat ($R^2 = 0,945$).

Taula 2.10: Coeficients de regressió i equació polinòmica de segon grau obtinguts a partir de la representació de l' a_w/m en funció de l' a_w ; constants i equació del model GAB.

Equació polinòmica de segon grau

$$a_w/m = -0,151 a_w^2 + 0,1556 a_w + 0,0081 \quad (R^2 = 0,9448)$$

$$\alpha = -0,151 \quad \beta = 0,1556 \quad \gamma = 0,0081$$

Model GAB

$$m = \frac{M_m C_G K a_w}{(1 - K a_w) [1 + (C_G - 1) K a_w]}$$

$$M_m = (-1 / (4\alpha\gamma - \beta^2))^{1/2} = 5,8617$$

$$K = -(\beta - 1/M_m) / (2\gamma) = 0,9258$$

$$C_G = 1 / (M_m \gamma K) = 22,7491$$

m = contingut en humitat en base a l'extracte sec.

M_m = contingut en humitat (en base a l'extracte sec) de la capa monomolecular.

C_G = constant de Guggenheim.

K = factor de correcció per a les molècules de la multicapa respecte al bulb líquid.

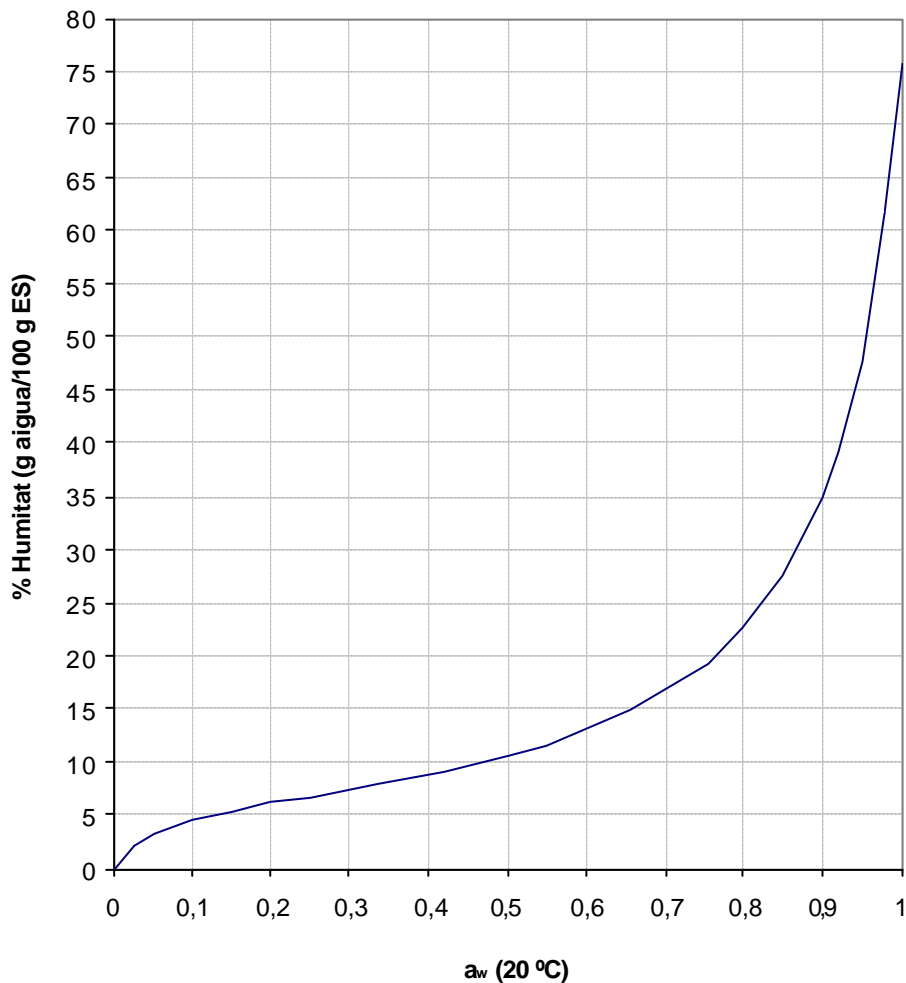


Figura 2.16: Isoterma d'adsorció a 20°C de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C obtinguda segons el model GAB (Guggenheim, Anderson i De Boer).

L'equació GAB és un bon model per estudiar el comportament d'adsorció del nostre producte deshidratat durant el període d'emmagatzematge. El contingut en humitat inicial mitjà de la FC deshidratada per atomització a 140°C és del 5,56 % (sobre extracte sec). Segons les isoterms de sorció obtingudes experimentalment, aquest percentatge d'humitat es correspon a un valor d' a_w a 20°C d'aproximadament el 0,2, valor que coincideix amb els valors obtinguts en la determinació gravimètrica de l' a_w en les mostres A, B i C de fracció cel·lular deshidratades per atomització a 140°C (Taula 2.9), mentre que segons la isoterma d'adsorció obtinguda pel model GAB, l' a_w del producte després de la deshidratació seria del 0,165.

És important destacar que fins a valors d' a_w de 0,2-0,25, encara ens trobem en la regió de la isoterma d'aigua fortament lligada a la proteïna en forma monocapa i aquesta aigua està molt poc o gens disponible. De manera que el contingut en humitat que s'assoleix després de la deshidratació de la FC hemolitzada es correspon, segons les isoterms de sorció, a una a_w prou baixa per garantir la conservació de FC en pols, sempre i quan aquesta s'envasi amb materials d'envasament tipus barrera que no permetin l'entrada d'humitat de l'exterior, doncs el desenvolupament de microorganismes patògens i/o deteriorants i la producció de toxines estan totalment inhibits, i la major part de les reaccions químiques i enzimàtiques de deteriorament no es poden produir.

A partir del model GAB també podem calcular el valor del contingut en aigua corresponent a la capa monomolecular d'aigua que recobreix la superfície de cada partícula (M_m). Aquest paràmetre reflexa el contingut en humitat que permet la màxima estabilitat en la majoria dels aliments perquè les reaccions microbiològiques i bioquímiques de deteriorament són mínimes (Castillo, 1997; Leung, 1987). En el cas de la FC deshidratada per atomització a 140°C, el contingut en humitat de la capa monomolecular és del 5,86 % (Taula 2.10) i l' a_w en la qual existeix la monocapa en aquest producte segons l'equació GAB és de 0,188. Donat que el percentatge d'humitat i l' a_w inicial del nostre producte en pols són menors que els valors en els quals existeix la monocapa, la conservació de la FC deshidratada està força garantida i pot tenir una vida útil bastant prolongada, sempre que s'envasi i emmagatzemi adequadament.

A les condicions d'activitat de l'aigua que existeixen al producte deshidratat només es poden produir reaccions d'autoxidació dels greixos (Troller, 1989). Tanmateix, encara que el nostre producte presenta un contingut en lípids bastant baix, inferior a l'1 % i, en principi, aquest tipus de deteriorament hauria de ser mínim, és important tenir en compte que el ferro del grup hemo pot actuar com a potent promotor o catalitzador de les reaccions d'oxidació autocatalítica dels greixos (Potter i Hotchkiss, 1995). Aquest fet, conjuntament amb els problemes de l'enfosquiment inherents a la FC, determinen la conveniència de l'eliminació del grup hemo de la fracció corpuscular quan aquest producte es destina a l'alimentació humana (Wismer-Pedersen, 1988). Per aquestes raons, per garantir el bon estat de conservació del producte, seria interessant estudiar el

grau d'oxidació lipídica que es produeix durant el període d'emmagatzematge i, en funció dels resultats obtinguts, tenir la precaució d'envasar la fracció cel·lular deshidratada en condicions d'absència d'oxigen i protegida de la llum.

2.5 CONCLUSIONS

La ultrasonicació permet produir l'hemòlisi dels eritròcits de la FC de la sang de porc amb la finalitat d'alliberar l'Hb del seu interior abans de la deshidratació per atomització. Les condicions considerades com a òptimes són tres períodes de 2 minuts a 75 W amb 1 minut de descans entre tractaments.

La millor temperatura de deshidratació per atomització de la FC hemolitzada és 140 °C, tenint en compte el màxim grau d'assecamment de la mostra sense que es produeixi una disminució important de la solubilitat de la proteïna. La FC hemolitzada i deshidratada per atomització presenta un contingut en humitat del 5,3 % i un percentatge de solubilitat proteica del 96 %. El procés tecnològic de deshidratació per atomització produeix modificacions dels paràmetres calorimètrics de la FC, fet que indica que la deshidratació induïx canvis en l'estructura nativa de l'Hb i, per tant, cert grau de desnaturalització proteica que pot conduir a una disminució de les seves propietats funcionals.

La càrrega contaminant de la FC fresca de la sang de porc és força elevada i el tractament amb ultrasons utilitzat per hemolitzar-la i la centrifugació posterior no produeixen una reducció significativa de la microbiota contaminant, obtenint un producte amb uns recomptes microbiològics de l'ordre de 10^6 ufc·mL⁻¹. La deshidratació per atomització produeix una disminució d'una unitat logarítmica dels recomptes totals de la FC hemolitzada. Malgrat tot, el producte deshidratat encara reflecteix l'elevada contaminació de la primera matèria i és susceptible de presentar *S. aureus* i formes esporulades de clostridis sulfit-reductors, fet que condiona negativament la seva utilització com a ingredient per a la indústria alimentària, a no ser que es millorin les condicions de recollida de la sang a l'escorxador o que aquesta o la FC es sotmeti a algun tractament d'higienització prèviament a la deshidratació.

L'extracte sec de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C està compost per un 94,6 % de proteïna, un 3 % de sals minerals i un 0,7 % de greix. Els valors de les coordenades de color CIE L*a*b* de la FC en pols són força constants i reflecteixen el color vermell marronós fosc d'aquesta, degut fonamentalment a que durant la deshidratació es produeix una oxidació del ferro hèmic de l'Hb.

Les isoterms de sorció a 20°C de la FC deshidratada per atomització tenen una forma sigmoïdal i presenten una histèresi estreta i llarga. L'equació GAB és un bon model

matemàtic per ajustar les dades de sorció obtingudes experimentalment i determinar la isoterma d'adsorció de la FC deshidratada per atomització, per conèixer la relació funcional entre el contingut en humitat i l'activitat de l'aigua del producte en pols. El percentatge d'humitat de la FC deshidratada a 140 °C es correspon, segons la isoterma d'adsorció obtinguda pel model GAB, a un valor d' a_w a 20 °C d'aproximadament el 0,17. Tenint en compte que ens troben per sota dels valors d' a_w corresponents a la capa monomolecular, podem garantir la conservació a temperatura ambient del producte, sempre i quan aquest s'envasi en recipients tancats que no permetin l'entrada d'humitat de l'exterior.

Capítol 3: Estabilització del color de la fracció cel·lular deshidratada per atomització per utilitzar-la com a colorant alimentari.

3.1 INTRODUCCIÓ

Malgrat que el poder colorant de l'hemoglobina suposa un handicap quan es vol afegir la FC com a ingredient en determinats aliments, i que es tendeix a sotmetre-la a diferents procediments de descoloració, la fracció corpuscular també es podria utilitzar com a un colorant alimentari d'origen natural en productes carnis per proporcionar diferents coloracions vermelles.

Els colorants naturals es consideren generalment com additius innocus, de manera que les limitacions específiques per a la seva utilització són menors que les que afecten als colorants artificials. Malgrat això, els naturals són menys estables i solen ser més cars que els obtinguts per síntesi química. Entre els diferents colorants vermells d'origen natural autoritzats trobem: el vermell Cotxinilla o àcid carmínic (E-120), obtingut a partir de les femelles d'uns insectes paràsits d'algunes espècies de cactus, és el colorant natural amb millors característiques tecnològiques, però la seva utilització està limitada pel seu elevat preu; la capsantina i capsorubina (E-160c) són els pigments del pebre vermell (*Paprika*) que s'utilitza com a colorant i aromatitzant en molts embotits i és força resistent a la llum i a la temperatura; el vermell remolatxa o betanina i betalaïna (E-162) és l'extracte aquós de la remolatxa vermella que resisteix les condicions àcides però s'altera fàcilment amb l'escalfament, especialment en presència d'aire, i es torna de color marró; i alguns antocians (E-163) responsables dels colors vermells, blaus i violetes de fruites i flors.

La possibilitat d'aprofitar la FC com a colorant alimentari és especialment interessant en aquells països en els que no estan permesos els colorants vermells artificials i, alhora, quan la FC es vulgui utilitzar pel seu elevat contingut en ferro, aprofitant el valor nutritiu de l'hemo, i en proteïnes amb molt bona funcionalitat.

Tanmateix, tal com s'ha descrit al Capítol 2, durant el procés de conservació de la FC mitjançant la deshidratació per atomització, es produeix un enfosquiment del producte perquè l'aire calent accelera l'oxidació del ferro del grup hemo de l'Hb, que passa a metaHb, pigment de color marró fosc en el qual el ferro està en forma fèrrica. En conseqüència, seria interessant trobar algun sistema que permeti protegir el color de la FC i estabilitzar el color vermell de l'Hb durant la seva deshidratació i posterior emmagatzematge del producte en pols. Una alternativa podria ser la deshidratació amb

un fluid calefactor diferent de l'aire, com el CO₂ o el N₂, però aquesta tecnologia encarriria molt el procés de deshidratació i no seria rendible econòmicament, i tampoc podem garantir l'estabilitat del color durant el període d'emmagatzematge.

També es podria utilitzar la liofilització per conservar la FC, tot i que és un procés molt car només aplicable a productes d'elevat valor afegit. Malgrat això, al nostre grup de recerca, s'han fet alguns estudis de l'aplicació de la liofilització per conservar la FC i es va veure que, si bé el color de la FC acabada de liofilitzar era millor que el de la FC deshidratada per atomització, la primera s'oxidava molt més ràpidament que l'atomitzada durant el període d'emmagatzematge (Altarriba, 2001). La major susceptibilitat a l'oxidació de la FC liofilitzada la van atribuir, per una banda, a la porositat del producte, que determinava una major superfície de contacte amb l'oxigen i, per l'altra, al menor contingut en humitat respecte de les mostres atomitzades. Sembla que el contingut en aigua residual dels productes assecats pot exercir cert efecte protector enfront les reaccions d'oxidació perquè dificulta l'accessibilitat de l'oxigen al grup hemo, mentre que valors d'humitats massa baixos, per sota de la capa monomolecular, poden fer que els ions metàl·lics quedin més exposats a l'oxidació.

Es va plantejar doncs, la possibilitat d'afegir algun additiu a la FC que tingués una activitat protectora enfront l'oxidació que es produeix durant la deshidratació, perquè el color vermell del producte es mantingui estable. Les possibles substàncies que es podien assajar havien de ser compostos amb activitat antioxidant o reductora i/o agents segrestants o quelants del ferro, de manera que el pigment hemo es mantingués estable enfront l'oxidació. També es va plantejar d'estudiar si la capacitat d'inhibició de l'oxidació de l'Hb de les diferents substàncies afegides es mantenia durant el període emmagatzematge del producte en pols.

Substàncies amb activitat antioxidant

Els antioxidants són aquelles substàncies que afegides a productes alimentaris prevenen, eviten o retarden les reaccions d'oxidació catalitzades per l'acció de l'oxigen, elevades temperatures, llum, elements metàl·lics, complexos enzimàtics o els microorganismes. Com a antioxidants alimentaris s'utilitzen diferents tipus de compostos amb activitat reductora, consumidors d'oxigen, segrestants o quelants.

Els antioxidants o agents reductors frenen les reaccions d'oxidació perquè ells mateixos són els que s'oxiden més fàcilment que el substrat al qual protegeixen i, per tant, endarrereixen l'alteració oxidativa de l'aliment però no l'eviten d'una forma definitiva.

Els agents quelants o segrestants tenen la capacitat de lligar els ions metàl·lics (com el coure i el ferro) que faciliten l'oxidació dels greixos i això fa que contribueixin en l'estabilització del color, aroma i textura dels aliments. En el nostre cas, el que ens

interessaria és quelar el ferro hemínic. Hi ha molts constituents naturals dels aliments que poden actuar com a agents quelants, per exemple: àcids dicarboxílics (oxàlic, succínic), hidroxiàcids (làctic, màlic, tartàric, cítric), àcid etilendiamonitetraacètic (EDTA), àcids polifosfòrics (ATP, pirofosfats), alguns aminoàcids, pèptids i proteïnes. Donat que les traces d'ions metàl·lics poden actuar com a catalitzadors de l'oxidació dels greixos, el seu lligam amb els agents quelants incrementa l'eficiència de l'activitat dels antioxidants (efecte sinèrgic amb els antioxidants primaris) i inhibeix l'oxidació de l'àcid ascòrbic i de vitamines liposolubles (E i D). De manera que, per exemple, algunes aplicacions dels agents quelants són millorar l'estabilitat de l'aroma i el color de productes vegetals tractats per calor, evitar la coagulació de la sang i l'agregació de les caseïnes en productes lactis (Belitz i Grosch, 1999).

3.2 OBJECTIUS

L'objectiu del present capítol és investigar el possible efecte estabilitzant del color vermell de la FC en pols d'algunes substàncies potencialment antioxidants a diferents concentracions. Amb aquesta finalitat, es vol determinar si l'addició de diferents concentracions de substàncies amb activitat antioxidant i/o segrestant del Fe hèmic (àcid ascòrbic, dextrina, glucosa, L-cisteïna, àcid nicotínic i nicotinamida) a la FC de la sang de porc evita l'enfosquiment oxidatiu que es produeix durant la deshidratació per atomització d'aquest producte.

També s'estudiarà si l'efecte antioxidant o protector del color es manté durant el període d'emmagatzematge de la FC en pols, determinant l'evolució en el temps del color de la FC deshidratada per atomització en funció del tipus d'antioxidant utilitzat i de la concentració afegida.

3.3 MATERIAL I MÈTODES

3.3.1 Disseny experimental

Per determinar l'efecte potencialment antioxidant i/o segrestant del Fe de cada substància es van dissenyar una sèrie d'experiments aleatoritzats per blocs complets. Els assaigs es van portar a terme sobre 5 mostres diferents de FC hemolitzada procedent de sang de porc (5 repeticions) per a cadascuna de les substàncies antioxidants assajades (àcid ascòrbic, dextrina, glucosa, L-cisteïna), mentre que en els cas de l'àcid nicotínic i la nicotinamida, es va fer sobre 3 repeticions de FC hemolitzada, ja que en la primera part

de l'estudi es va veure que els resultats eren força reproduïbles malgrat la variabilitat entre mostres.

Cada mostra es va dividir en cinc alíquotes, a les quals es van addicionar diferents concentracions de l'antioxidant: 0 % (control); 0,25; 0,5; 1 i 2 % (p/v) abans de deshidratar-les per atomització. En el cas de la nicotinamida, les concentracions afegides van ser: 0; 1; 1,5; 2 i 2,5 % (p/v). Finalment, es va avaluar l'evolució dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color de la FC en pols obtinguda de cada alíquota durant un període de dos mesos d'emmagatzematge, prenent mesures el dia zero (mostres acabades de deshidratar), els dies 1, 2, 3, 5 i 7 i després en intervals cada 7 dies fins el dia 63.

3.3.2 Addició dels antioxidants a la fracció cel·lular i deshidratació de les mostres per atomització

Es van utilitzar mostres de sang de porc recollides del tanc d'emmagatzematge en refrigeració d'un escorxador industrial de característiques descrites a l'apartat 2.3.2 i les mostres de fracció cel·lular hemolitzada es va obtenir segons el mateix procediment descrit a l'apartat 2.3.3. Tots els experiments es van realitzar amb mostres de sang recollides en diferents dies però en les mateixes condicions.

Com a possibles additius antioxidants i/o quelants es van escollir sis substàncies que són additius alimentaris àmpliament utilitzats. Aquest foren: Àcid Ascòrbic (E-330) i Dextrina LSN, ambdós per a ús alimentari industrial (SBI, Systems Bio-Industries, S.A., Rubí, Barcelona), D (+)-Glucosa PRS-CODEX (Panreac Química, S.A., Montcada i Reixach, Barcelona), L-Cisteïna (Merck KgaA, Damstadt, Alemanya), Àcid Nicotínic i Nicotinamida, ambdós de Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanya). Les diferents concentracions dels additius s'afegien al concentrat d'Hb obtingut després de l'hemòlisi i posterior centrifugació de la FC, just abans de la seva deshidratació per atomització. Donat que l'addició dels àcids ascòrbic i nicotínic produïa una acidificació de la FC proporcional a la dosi afegida (fins a pH 6,34 en el cas d'afegir-ne un 2 % d'ascòrbic i pH 5,5 amb un 2 % de nicotínic), s'ajustava el pH d'aquesta a 7,4-7,5 (pH natural de la FC control) amb NaOH 1 N. En el cas dels altres antioxidants assajats, es comprovava que es mantenia el mateix pH que el de la FC fresca.

Les mostres de FC hemolitzada amb l'antioxidant sempre es van deshidratar per atomització el mateix dia d'haver recollit la sang. Les condicions del procés de deshidratació van ser les mateixes que les descrites a l'apartat 2.3.3 del capítol 2. Les mostres en pols es van emmagatzemar a temperatura ambient al laboratori en recipients de plàstic tancats durant tot el temps que va durar l'assaig.

3.3.3 Determinació del color

L'evolució dels paràmetres del color CIE L*, a* i b* en el temps durant un període de dos mesos es va determinar amb un colorímetre Minolta CR-300 (Minolta Co., Ltd., Osaka, Japó) segons la metodologia descrita a l'apartat 2.2.6.2. Cada determinació es va fer individualment sobre cada mostra per triplicat.

3.3.4 Tractament estadístic de les dades

L'anàlisi estadística dels resultats obtinguts es va realitzar mitjançant l'anàlisi de la variància (ANOVA) de mesures repetides amb les dades log-transformades, utilitzant el procediment GLM (General Linear Model) disponible al paquet estadístic SAS (SAS Institute, Inc., 1990). Aquest tractament va permetre estudiar els efectes entre factors (efecte de la concentració d'antioxidant afegida i de la mostra de FC o repetició), i els efectes intra factors (efecte del temps d'emmagatzematge i de les interaccions entre ambdós tipus d'efectes, temps*concentració d'antioxidant i temps*mostra). Es van considerar com a significatius els valors de probabilitat inferiors a 0,05. Per a la comparació múltiple de mitjanes es va aplicar el test de Tukey-Kramer HDS amb un nivell de significació de $P=95\%$.

3.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

En aquest apartat s'exposen els resultats obtinguts en la determinació dels efectes de l'addició de diferents substàncies antioxidants i/o segrestants del Fe a la FC hemolitzada, per estabilitzar el seu color i evitar o disminuir l'enfosquiment oxidatiu que es produeix durant la deshidratació per atomització i el posterior emmagatzematge del producte en pols a temperatura ambient.

3.4.1 Efecte de l'addició d'àcid ascòrbic

L'àcid L-ascòrbic o vitamina C (E-300) és un dels antioxidants naturals més amplament utilitzat a la indústria alimentària. Els seus efectes antioxidants es deuen a que protegeix els dobles enllaços i també segresta l'oxigen. Les seves propietats redox li permeten actuar com a agent reductor i com a segrestant de radicals lliures; a més, la seva capacitat d'actuar com a un agent sinèrgic fa que pugui reconvertir els productes oxidats en la seva forma reduïda (Niki *et al.*, 1984, a; Núñez-Delicado *et al.*, 1997).

L'àcid ascòrbic i les seves sals (ascorbat sòdic E-301 i ascorbat càlcic E-302) s'utilitzen molt com antioxidants en productes carnis, conserves vegetals, suc de fruita, begudes refrescants, i en la cervesa per eliminar l'oxigen de l'espai de cap. En la tecnologia dels productes carnis, l'ascòrbic i els seus derivats també eviten la formació de nitrosamines. Tanmateix, l'addició d'àcid ascòrbic com antioxidant en un aliment no permet fer un ús publicitari de l'enriquiment en vitamina C de l'aliment. En productes de panificació i rebosteria, l'àcid ascòrbic s'utilitza com a millorant de les masses. La farina té un enzim, l'àcid ascorbicoxidasas, que transforma l'ascòrbic en àcid dehidroascòrbic (ADHA), el qual té efectes oxidants sobre les proteïnes formadores de gluten i per això s'utilitza per augmentar la força de les farines.

L'oxidació de l'àcid ascòrbic a ADHA depèn de diversos paràmetres com la pressió parcial d'oxigen, el pH, la temperatura i la presència d'ions metàl·lics. La presència d'aquests últims, particularment Cu^{2+} i Fe^{3+} , fa que la velocitat de la reacció de destrucció de l'ascòrbic sigui més ràpida que l'autoxidació espontània no catalitzada per metalls. L'àcid ascòrbic, el dehidroascòrbic i els seus productes de degradació, en presència d'aminoàcids, es poden transformar en compostos de color marró a través de les reaccions d'enfosquiment no enzimàtic. Un exemple d'aquest fenomen és la reacció del ADHA amb compostos amino per donar pigments marronosos que causen l'enfosquiment indesitjable en suc de fruits cítrics i fruites deshidratades (Belitz i Grosch, 1999).

A les Figures 3.1, 3.2 i 3.3 es mostren els valors de l'evolució de L^* , a^* i b^* en el temps en funció de la concentració d'àcid ascòrbic afegida. Es pot observar que l'addició de les diferents concentracions d'àcid ascòrbic a la FC té un efecte significatiu sobre la variació de tots els paràmetres del color.

La concentració d'ascòrbic afegida afectava significativament ($P < 0,05$) el paràmetre L^* del color (lluminositat). Globalment, s'observava una tendència a incrementar el valor de L^* en augmentar la concentració d'àcid ascòrbic. Tanmateix, només l'addició d'un 2 % d'ascòrbic suposava un augment significatiu de la lluminositat respecte de les mostres control, tant a l'inici com a final de l'experiment. També s'ha observat una variació significativa durant el temps d'emmagatzematge i un efecte significatiu de la mostra sobre l'evolució de L^* . Malgrat tot, la pauta de variació que experimentava el paràmetre L^* durant els dos mesos d'emmagatzematge no depenia significativament de la concentració d'antioxidant afegida. L'increment de lluminositat experimentat per la FC en pols demostra que una addició del 2 % d'ascòrbic té cert efecte blanquejant i redueix el fenomen de l'enfosquiment que produeix el procés de deshidratació per atomització.

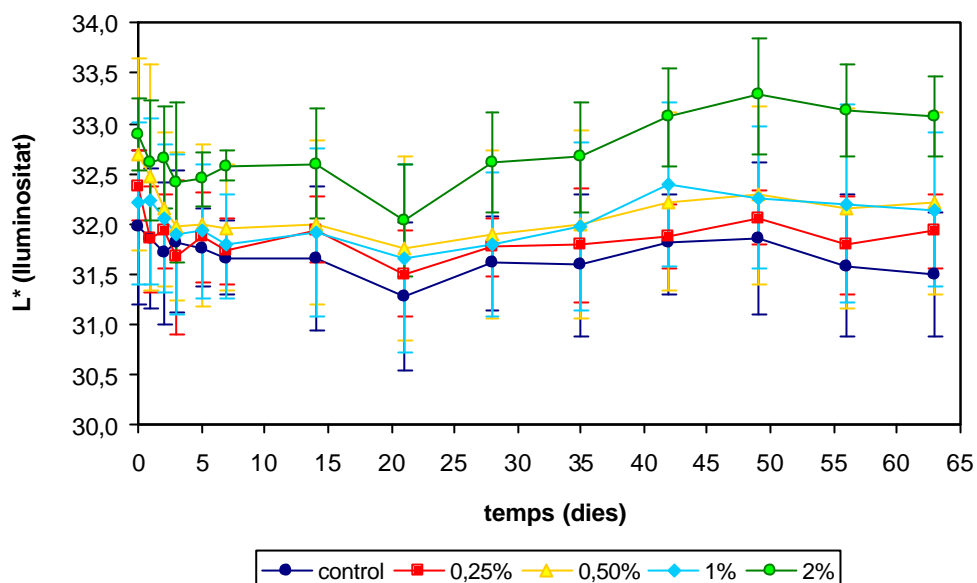


Figura 3.1: Evolució del paràmetre L* (luminositat) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid ascòrbic. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

Per altra banda, la concentració d'àcid ascòrbic afectava de forma significativa ($P<0,05$) als valors a^* i b^* del color. En augmentar la concentració d'ascòrbic, disminueixen les tonalitats vermella i groga del producte respecte de les mostres control. El temps d'emmagatzematge tenia un efecte molt significatiu ($P<0,05$) sobre els valors a^* i b^* en tots els tractaments. El descens de la coordenada vermella (a^*) es produïa fonamentalment durant el primer dia després de la deshidratació, a partir del qual, aquest paràmetre tendia a estabilitzar-se. Malgrat que no existia un efecte significatiu de la concentració sobre la disminució de a^* durant el període d'emmagatzematge, al finalitzar l'assaig es va observar que l'efecte d'un tractament era significativament diferent de qualsevol altre, seguint una relació inversa, és a dir, a major concentració d'àcid ascòrbic, menor era la tonalitat vermella del producte. També s'ha observat que la variació d' a^* depenia significativament de la mostra.

Quant a la coordenada groc-blau (b^*), la seva disminució durant l'emmagatzematge depenia de forma significativa ($P<0,05$) tant de la concentració d'antioxidant com de la mostra. Els tractaments amb un 2 % d'àcid ascòrbic presentaven una pauta de variació durant l'emmagatzematge diferent al de les altres concentracions. La tonalitat groga de les mostres amb un 2 % d'ascòrbic tendeix a augmentar progressivament durant l'emmagatzematge, però el valor de b^* és menor que el de les mostres sense ascòrbic.

Està descrit que en productes carnis el comportament del valor de b^* sol ser similar al del paràmetre a^* (Pérez-Álvarez *et al.*, 1998). La disminució de les tonalitats vermella (a^*) i groga (b^*) del color produïda per l'addició d'ascòrbic sembla indicar que aquest additiu,

encara que disminueix l'enfosquiment (produeix un augment del valor de L^*), no evita l'oxidació del ferro de l'Hb, com per permetre una millora de la tonalitat del color.

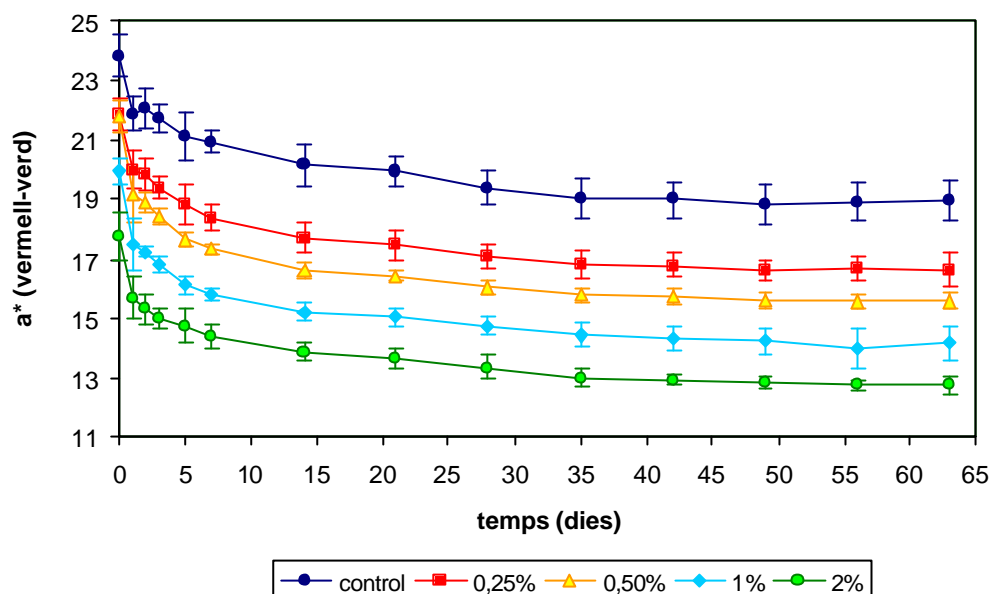


Figura 3.2: Evolució del paràmetre a^* (vermell-verd) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid ascòrbic. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

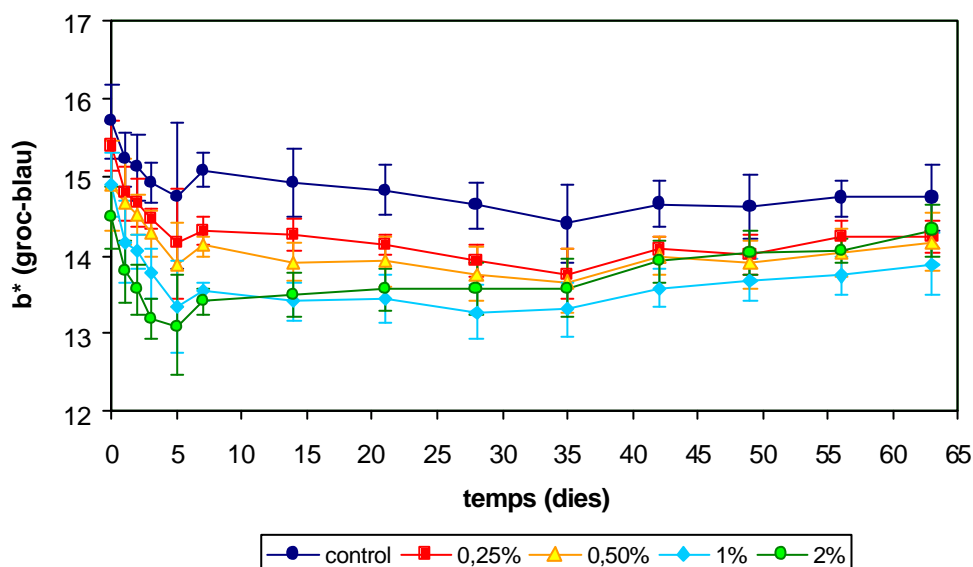


Figura 3.3: Evolució del paràmetre b^* (groc-blau) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid ascòrbic. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

Lee *et al.* (1998) van estudiar els efectes de l'addició d'àcid ascòrbic sobre la degradació de la riboflavina (vitamina B2) induïda per la llum i els canvis de color en mostres de llet.

Aquests autors van trobar que el tractament de la llet amb àcid ascòrbic protegia de forma eficaç a la riboflavina de la fotodegradació i que inhibia la disminució dels paràmetres verd (-a*) i groc (+b*) que es produeix per l'exposició de la llet a la llum. Aquesta activitat protectora del color i del contingut en riboflavina de la llet la van atribuir a la capacitat que té l'àcid ascòrbic de lligar l'oxigen.

Per contra, Carlez *et al.* (1995) van investigar els efectes de l'addició de diferents agents reductors com àcid ascòrbic, nicotinamida i àcid nicotínic, a la carn picada de vedella, per prevenir els efectes negatius de l'alta pressió hidrostàtica sobre el color de la carn. Van observar que l'addició de nicotinamida i àcid nicotínic feia disminuir lleugerament el valor de a*, però produïa un increment del b*, i això es traduïa en què les mostres additivades fossin lleugerament més grogues i més griseses que les no tractades. L'addició d'àcid ascòrbic a la carn picada per evitar l'oxidació de la mioglobina a metaMb, tampoc tenia un efecte protector del color. Aquests autors van trobar que l'ascòrbic provocava una disminució del paràmetre a* i un increment de la concentració de metaMb. Alguns autors han suggerit que l'àcid ascòrbic pot actuar com a pro-oxidant a elevades concentracions o en presència d'ions metàl·lics com el coure o el ferro lliure o lligat (Mitsumoto *et al.*, 1991).

En conseqüència, donat que la FC és una font important de ferro, podria passar que l'ascòrbic s'oxidés a ADHA, a expenses de la reducció del Fe³⁺ a Fe²⁺, la qual cosa tindria un efecte protector enfront l'oxidació del grup hemo. Tanmateix, hem observat que la presència d'àcid ascòrbic a la FC afavoreix la conversió de l'Hb en metaHb durant la deshidratació i l'emmagatzematge. Això es tradueix en l'obtenció d'un producte en pols de color més marró que les mostres control, com a resultat de la disminució dels components vermell i groc del color, però a la vegada menys fosc, a causa de l'augment de la lluminositat.

La vitamina C, en concentracions superiors al 0,5 % (5000 ppm) en una solució d'Hb, pot actuar com a pro-oxidant i, en concentracions inferiors al 0,02% en una solució de carotè-linoleat, pot actuar com a pro-oxidant en presència d'ions metàl·lics (Kanner *et al.*, 1977, a: Mitsumoto *et al.*, 1991). Per tant, quan s'utilitzi la vitamina C en baixes concentracions, és necessària l'addició de quelants dels metalls per suprimir o evitar les reaccions pro-oxidants, o bé la utilització d'una combinació de varis additius amb activitat antioxidant. Mitsumoto *et al.* (1991) van estudiar l'efecte de l'addició de vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (àcid L-ascòrbic) i la seva combinació (Vit E+C) sobre l'estabilitat dels pigments i dels lípids en carn de vedella picada. Van trobar que la màxima oxidació de la mioglobina a metaMb i l'oxidació lipídica es produïa a les mostres no tractades. L'oxidació del pigment i dels lípids era moderada a les mostres tractades amb Vit E i baixa a les tractades amb Vit C, mentre que la combinació Vit E+C era la que permetia la mínima oxidació (efecte sinèrgic). Sembla que una excessiva addició de Vit E a la carn podria accelerar l'oxidació lipídica i alhora causar una major oxidació de la Mb en comparació

amb les mostres no tractades. Tanmateix, l'efecte sinèrgic de l'addició de Vit E+C permetia el manteniment del color vermell brillant i prevenia la rancidesa de la carn picada, i això possiblement era causat perquè la Vit E actua com a antioxidant primari i la Vit C pot regenerar de nou Vit E.

3.4.2 Efecte de l'addició de dextrina

Les dextrines estan formades per varis residus de D-glucosa de longitud de cadena intermèdia, que s'obtenen a partir del midó mitjançant la hidròlisi àcida o amb amilases. A la indústria alimentària, les dextrines s'utilitzen principalment com a agents espesseïdors i estabilitzats de suspensions, però donat que són carbohidrats reductors, tenen una activitat antioxidant potencial. Addicionalment, presenten l'avantatge que són uns productes molt econòmics.

A les Figures 3.4, 3.5 i 3.6 es mostren els valors de l'evolució de L^* , a^* i b^* en el temps en funció de la concentració de dextrina afegida. De forma global, s'observa una tendència a augmentar la lluminositat del producte a major concentració de dextrina. Tanmateix, l'augment del paràmetre L^* del color a causa d'un increment de la concentració no era significatiu. Per altra banda, es va trobar un efecte significatiu ($P < 0,05$) del temps d'emmagatzematge sobre la lluminositat de totes les mostres. Durant la primera setmana d'emmagatzematge es produïa una lleugera disminució de la lluminositat i després tendia a estabilitzar-se.

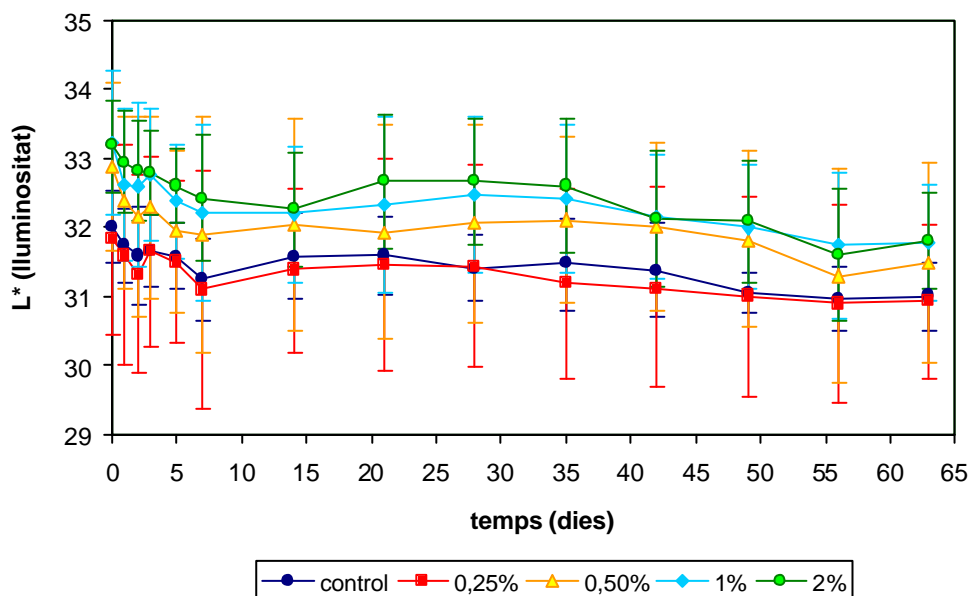


Figura 3.4: Evolució del paràmetre L^* (lluminositat) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de dextrina. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

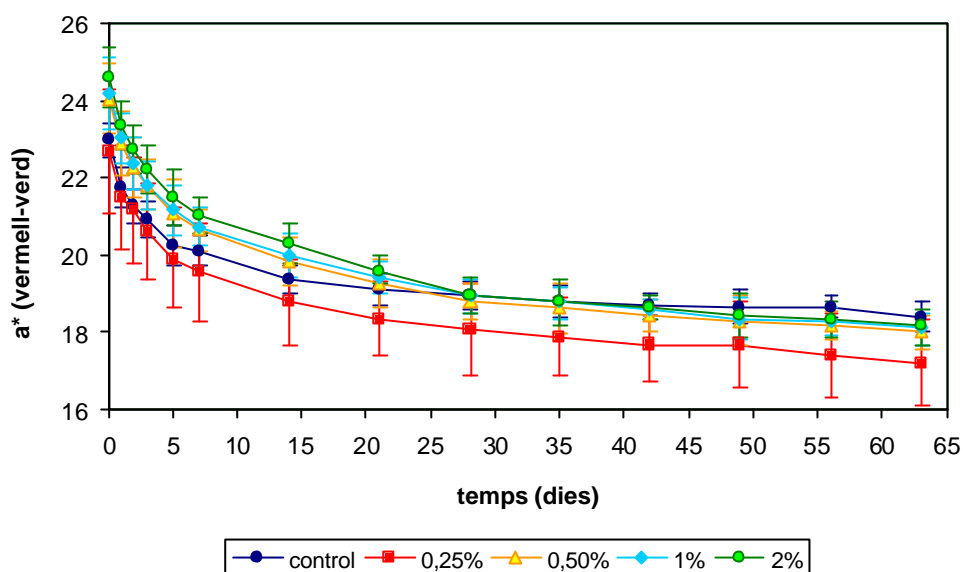


Figura 3.5: Evolució del paràmetre a^* (vermell-verd) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de dextrina. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

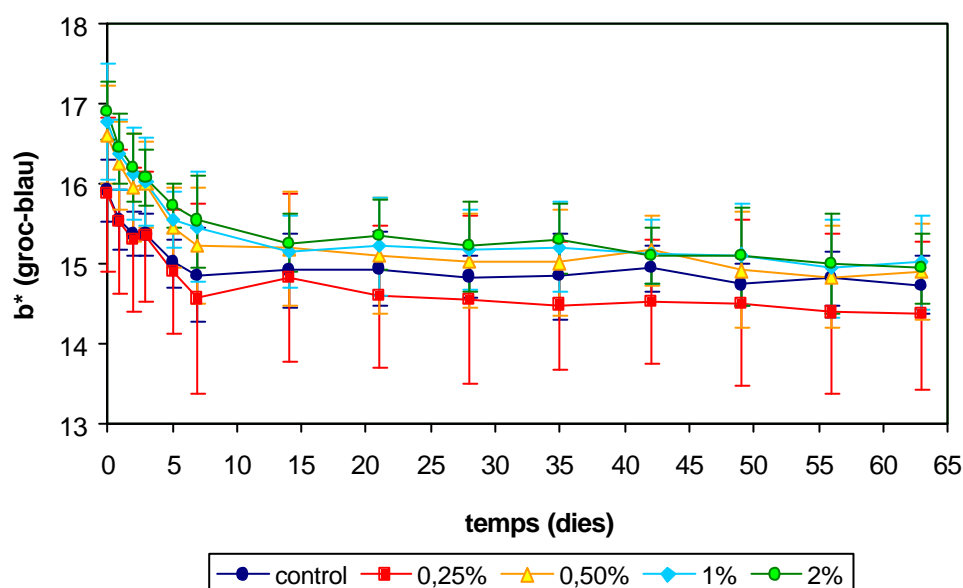


Figura 3.6: Evolució del paràmetre b^* (groc-blau) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de dextrina. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

La concentració de dextrina no afectava significativament a les coordenades a^* i b^* del color, malgrat que s'observava un increment de la tonalitat groga ($+b^*$) a partir d'un 0,5 % de dextrina. Per altra banda, existia una variació significativa ($P<0,05$) de les coordenades a^* i b^* durant el temps demmagatzematge. Durant la primera setmana d'emmagatzematge es produïa un descens marcat de les tonalitats vermella i groga del

color i després disminueixen de forma lenta o tendien a estabilitzar-se, fonamentalment a les mostres control.

S'ha proposat la utilització de la dextrina o derivats, com les ciclodextrines, com a antioxidants secundaris d'origen natural per potenciar l'efecte de l'antioxidant principal (àcid ascòrbic) als aliments, per reduir els nitrats en productes carnis curats (Núñez-Delgado, *et al.*, 1997), o com agents encapsuladors per protegir el color dels pigments de productes carnis curats cuits (Shahidi i Pegg, 1991). En el nostre estudi, la dextrina havia de tenir un comportament reductor; tanmateix, no ha presentat els efectes que esperàvem. En efecte, les diferents concentracions de dextrina adicionades al concentrat d'Hb no han estabilitzat de forma significativa el color durant l'emmagatzematge del producte. Per tant, aquesta substància no presenta una activitat protectora de l'oxidació del grup hemo de la FC.

3.4.3 Efecte de l'addició de glucosa

La D-glucosa és un sucre reductor molt utilitzat a la indústria alimentària. Entre les seves possibles aplicacions com a additiu antioxidant cal destacar que evita les oxidacions produïdes per la presència d'oxigen en aliments i begudes, redueix els nitrats als productes carnis curats, inhibeix l'oxidació d'alguns pigments carnis i millora la conservació del color. També s'uneix al Fe^{2+} hèmic de forma estable per formar glicosilHb.

L'evolució dels valors CIE $L^*a^*b^*$ del color de la FC en pols en funció de la concentració de glucosa es mostren a les Figures 3.7, 3.8 i 3.9. La concentració de glucosa tenia un efecte significatiu ($P < 0,05$) sobre els paràmetres L^* i b^* del color, mentre que no té cap efecte sobre el paràmetre a^* . L'addició d'un 1 o un 2 % de glucosa incrementava significativament la lluminositat del producte tant al principi com al cap de dos mesos d'emmagatzematge. El mateix comportament es va observar amb el 2 % de glucosa sobre la tonalitat groga ($+b^*$). Durant el període d'emmagatzematge s'observava una disminució significativa de la lluminositat i de les coordenades vermella i groga del color de la FC en pols.

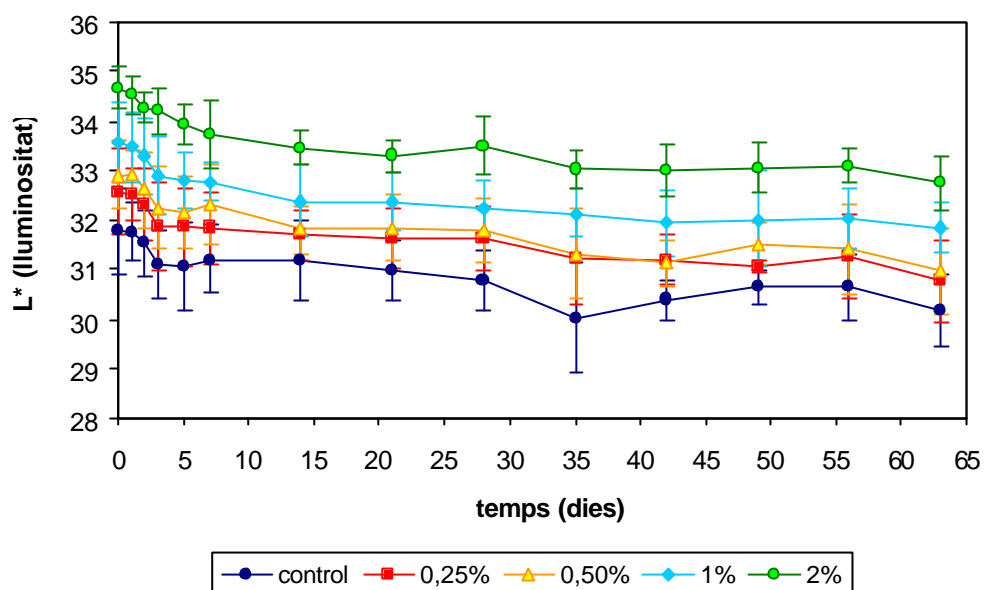


Figura 3.7: Evolució del paràmetre L* (luminositat) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de glucosa. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

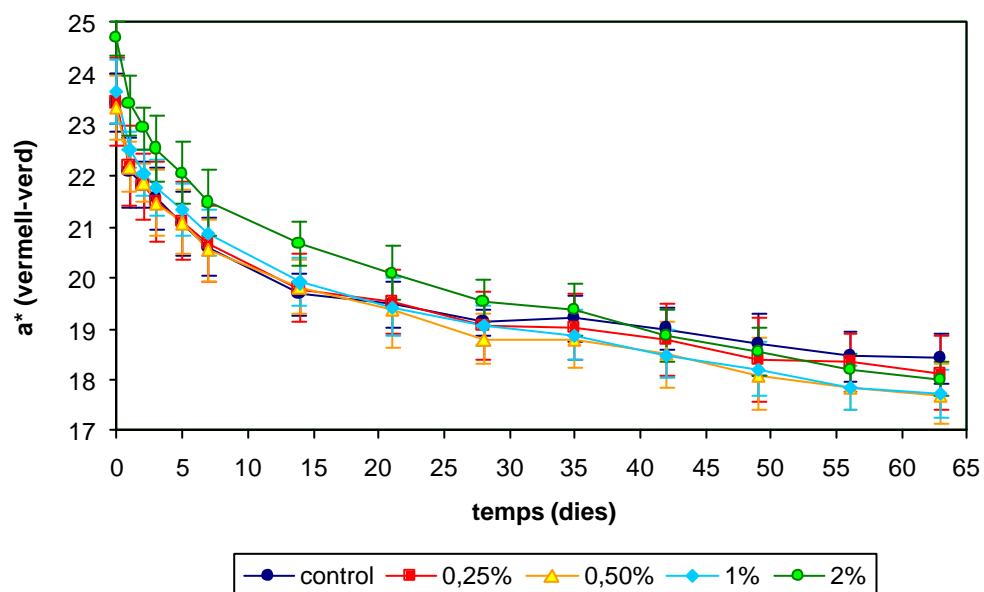


Figura 3.8: Evolució del paràmetre a* (vermell-verd) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de glucosa. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

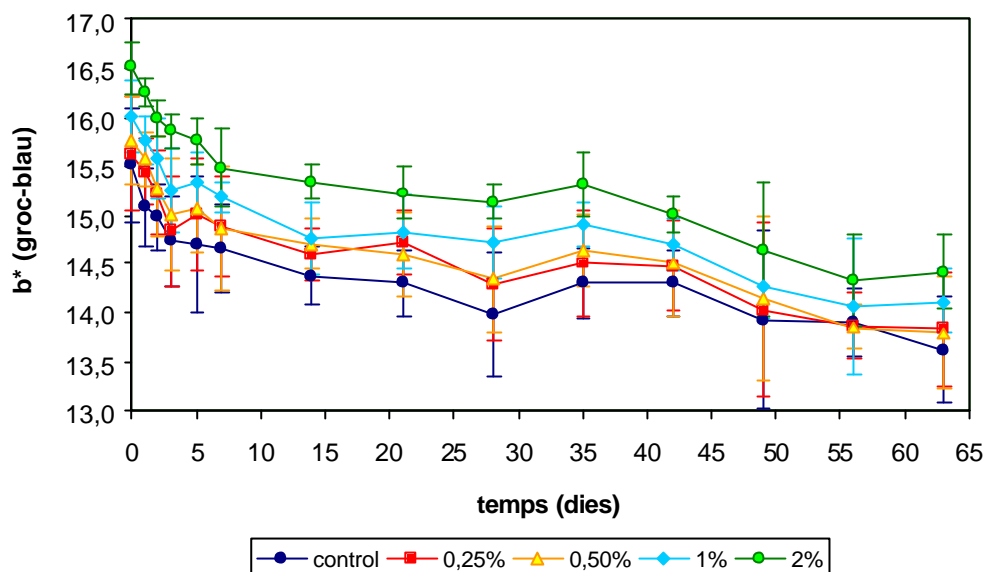


Figura 3.9: Evolució del paràmetre b^* (groc-blau) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de glucosa. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

També es va observar una interacció significativa ($P<0,05$) entre el temps i la mostra sobre els 3 paràmetres de color, i entre el temps i la concentració sobre el paràmetre a^* , de manera que la disminució de L^* , a^* i b^* depenia de la mostra, i l'evolució del paràmetre a^* en el temps era diferent en funció de la concentració de glucosa afegida. Malgrat que les mostres amb un 2 % de glucosa eren lleugerament més vermelles que la resta, a partir d'un mes d'emmagatzematge ja no s'observaven diferències entre cap dels tractaments assajats.

La presència d'oxigen i de cations metàl·lics a la FC pot fer disminuir l'efecte reductor de la glucosa, fonamentalment al cap d'uns dies de la seva addició, i no tindria un efecte antioxidant suficient per protegir al grup hemo de l'oxidació durant el període d'emmagatzematge. Tanmateix, tal com hem observat amb l'addició de l'àcid ascòrbic, la glucosa redueix significativament l'enfosquiment del producte deshidratat, obtenint un producte marró menys fosc que quan no s'afegeixen substàncies antioxidants.

3.4.4 Efecte de l'addició de L-Cisteïna

La L-Cisteïna (E-920) és un aminoàcid reductor amplament utilitzat en panificació com a additiu millorant, en forma de clorhidrat de cisteïna, amb efectes contraris als produïts per l'àcid dehidroascòrbic, és a dir, quan l'objectiu és reduir els enllaços disulfur de les proteïnes del gluten per disminuir la força de les farines. La cisteïna quan s'oxida es converteix en cistina, la qual està formada per dos residus de cisteïna units per un pont disulfur.

L'evolució dels valors CIE L*a*b* del color de la FC en pols en funció de la concentració de L-Cisteïna afegida es mostren a les Figures 3.10, 3.11 i 3.12. En general, es pot observar que l'addició de cisteïna no ha tingut un efecte protector sobre la lluminositat de la FC. L'anàlisi estadística va mostrar que la concentració de cisteïna no tenia un efecte significatiu sobre la lluminositat de la FC en pols. En canvi, sí que existia un efecte significatiu de la mostra sobre els valors de L*.

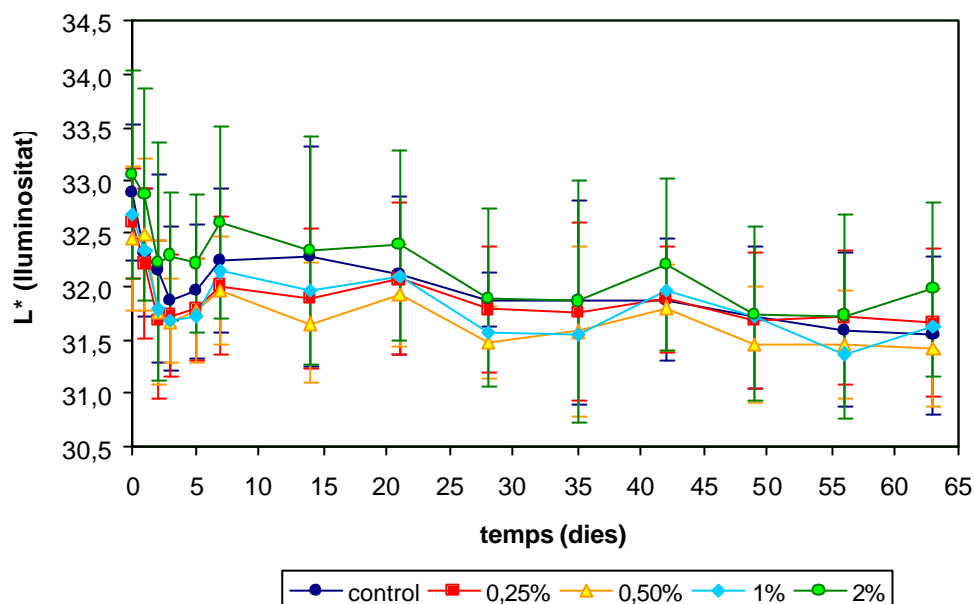


Figura 3.10: Evolució del paràmetre L* (lluminositat) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de L-Cisteïna. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

L'evolució de la lluminositat de les diferents mostres depenia significativament ($P<0,05$) del temps d'emmagatzematge. Els valors de la lluminositat disminuïen ràpidament durant els primers 5 dies d'emmagatzematge, i després disminuïen d'una forma progressiva i, a la vegada, bastant irregular, independentment de la concentració de cisteïna afegida. Aquesta oscil·lació observada en l'evolució de L* es deu a la variabilitat que existeix entre les diferents mostres de FC, que justifica l'efecte significatiu de la mostra. L'evolució de la lluminositat en el temps que va durar l'assaig era diferent en funció de la mostra o repetició de FC (interacció significativa temps*mostra).

Pel que fa als efectes de la cisteïna sobre els valors de les coordenades vermell-verd (a^*) i groc-blau (b^*) de la FC en pols es va observar que, en general, totes les mostres additivades eren menys vermelles i menys grogues que les mostres control. Els valors de a^* i b^* disminuïen significativament ($P<0,05$) en incrementar la concentració de cisteïna afegida. L'efecte de la cisteïna sobre els paràmetres a^* i b^* és molt semblant al comportament observat quan s'afegeix ascòrbic, és a dir, un augment de la concentració de cisteïna fa disminuir les tonalitats vermella i groga de la FC. En el cas del paràmetre

a^* , les mostres control eren significativament més vermelles que les que contenien cisteïna. Després de la deshidratació, el valor de a^* de les mostres amb un 2 % de cisteïna era de 20,2, unes 3,5 unitats inferior al de les mostres control (23,8). Quant al paràmetre b^* , també es va trobar que la seva variació depenia de la mostra ($P < 0,05$).

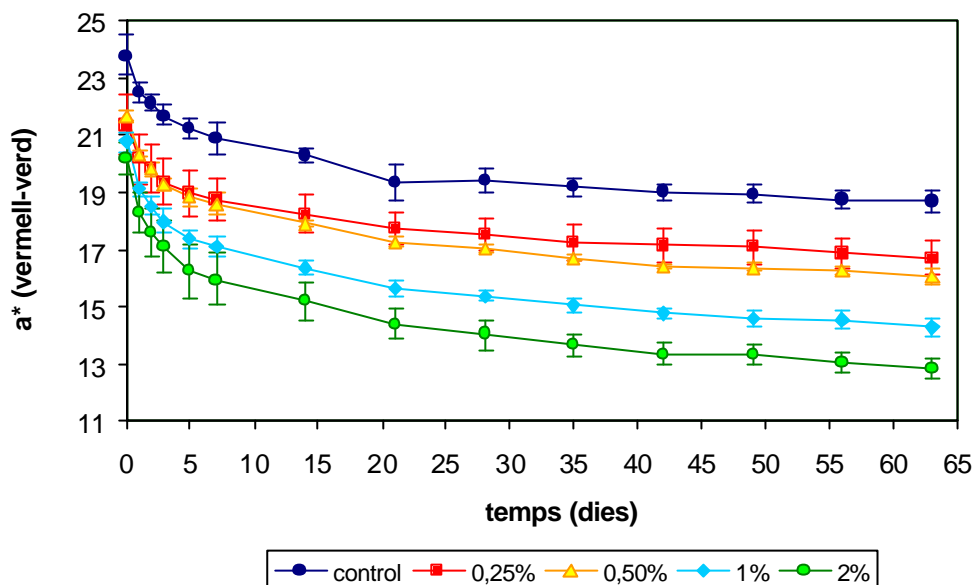


Figura 3.11: Evolució del paràmetre a^* (vermell-verd) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de L-Cisteïna. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

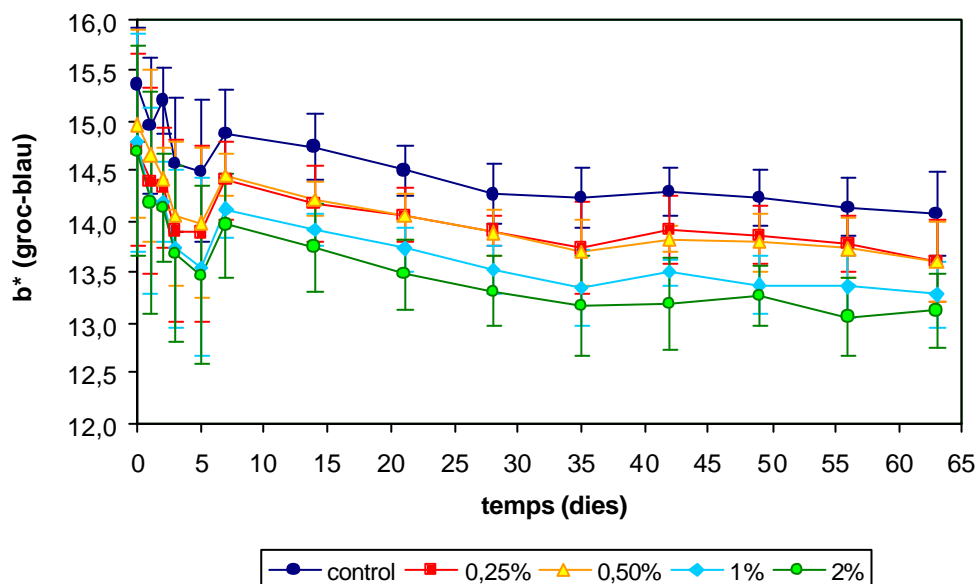


Figura 3.12: Evolució del paràmetre b^* (groc-blau) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de L-Cisteïna. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

Quant a l'efecte del temps d'emmagatzematge sobre els valors a^* i b^* , existia una variació significativa ($P < 0,05$) de les tonalitats vermella i groga durant els 2 mesos que va durar l'assaig, en tots els tractaments. També es va observar una interacció significativa ($P < 0,05$) de la mostra de FC (repetició) i de la concentració amb el factor temps, la qual cosa significa que tant el descens de la coordenada vermella (a^*) com el de b^* (grog) durant l'emmagatzematge, depenien de la concentració de cisteïna afegida i de la mostra.

La coordenada vermella (a^*) disminueix fonamentalment durant la primera setmana després de la deshidratació, a partir de la qual, la disminució d'aquest paràmetre és moderada fins aproximadament uns 20 dies d'emmagatzematge. Després, aquest paràmetre experimentava una pauta de disminució més progressiva, malgrat que en les mostres control, sembla que el color vermell tendeix a estabilitzar-se. Al cap de 2 mesos, la diferència entre el valor de a^* de les mostres amb un 2 % de cisteïna i les mostres control era d'unes 6 unitats, arribant a valors de a^* de 12,8 i 18,7, respectivament. En el cas de l'evolució de b^* durant l'emmagatzematge, també es va observar una reducció marcada del color groc durant els 5 primers dies després de la deshidratació, mentre que després disminuïen més lentament.

Per tant, a diferència de l'àcid ascòrbic i la glucosa, que produeixen un aclariment de la FC, la cisteïna no només no evita l'enfosquiment oxidatiu que es produeix durant la deshidratació, sinó que a més produeix una disminució del color vermell i groc del producte. La cisteïna, a les dosis assajades, no té cap efecte protector del color de la FC i afavoreix l'oxidació de l'Hb a metaHb durant l'emmagatzematge.

Segons Carlez *et al.* (1995), que van estudiar els efectes de l'addició de diferents antioxidants o estabilitzats del color (àcid nicotínic, nicotinamida, àcid ascòrbic, cisteïna i nitrit sòdic) per prevenir els canvis de color en la carn de vedella picada, quan es sotmet a un tractament amb altes pressions hidrostàtiques, van observar que l'addició de cisteïna abans de la pressurització no tenia efectes significatius sobre els valors de L^* , a^* i b^* respecte de les mostres no additivades.

Algunes substàncies reductores poden afavorir les reaccions de formació de nitrosil mioglobina (NO-Mb), pigment responsable del color dels productes carnis curats, a partir de nitrit metaMb (MetMb-NO₂). S'ha vist que la cisteïna pot tenir la mateixa eficàcia reductora que l'ascòrbic sobre la metaMb, per estabilitzar el color de pastes fines tipus frankfurt, després d'haver eliminat l'oxigen i de la cocció, a determinades condicions de pH (6) i temperatura (40°C). Però en presència d'oxigen, l'ascorbat és més efectiu que la cisteïna (Fox i Ackerman, 1968). L'aire calent utilitzat durant la deshidratació, i la presència d'oxigen a l'interior de l'envàs de la FC durant l'emmagatzematge segurament han determinat la pèrdua de l'activitat reductora de la cisteïna als nostres assaigs.

A partir dels resultats obtinguts amb l'àcid ascòrbic, dextrina, glucosa i cisteïna, es va continuar investigant en la possibilitat d'afegir altres compostos antioxidants o segrestants del ferro a la FC per estabilitzar el color vermell del grup hemo. Concretament, s'han assajat els efectes de l'addició de l'oxalat sòdic, fumarat sòdic, àcid nicotínic, nicotinat sòdic i la nicotinamida (Altarriba, 2001; Lorca, 2001). Entre aquests últims, les sals sòdiques de l'oxàlic, fumàric i nicotínic no presentaven gaire eficàcia quant a impedir o evitar l'oxidació de l'Hb durant la deshidratació i l'emmagatzematge. Per contra, amb l'addició d'àcid nicotínic i de nicotinamida es van observar resultats positius sobre el color de la FC.

3.4.5 Efecte de l'addició d'àcid nicotínic

L'àcid nicotínic és la forma en la qual es troba la vitamina hidrosoluble Niacina o Nicotinamida (factor PP antipel·lagra) als aliments (Belitz i Grosch, 1999). L'àcid nicotínic és un additiu utilitzat com a regulador del pH (E-375) i també pot actuar com a agent segrestant d'ions metàl·lics; per tant, potencialment, pot quelar el Fe de l'Hb i evitar la seva oxidació. L'evolució de L^* , a^* i b^* en el temps i en funció de la concentració d'àcid nicotínic es pot observar a les Figures 3.13, 3.14 i 3.15. L'addició de les diferents concentracions d'àcid nicotínic a la FC tenia un efecte significatiu sobre la variació dels 3 paràmetres del color. També es va observar un efecte significatiu de la mostra i que l'evolució de L^* , a^* i b^* durant el període d'emmagatzematge depenia significativament de la mostra, com a conseqüència de l'elevada variabilitat entre les repeticions de FC.

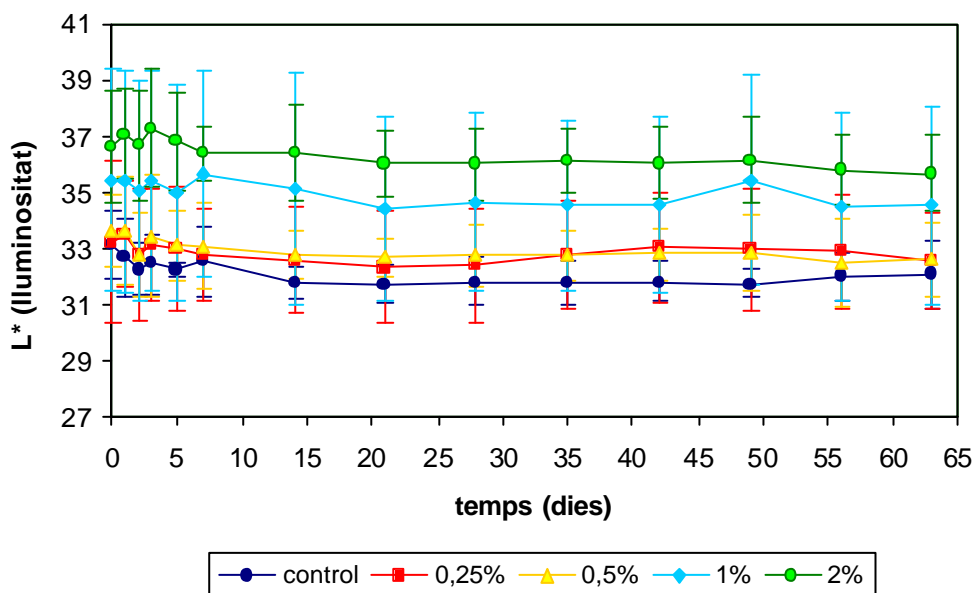


Figura 3.13: Evolució del paràmetre L^* (Iluminositat) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid nicotínic. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

La lluminositat (L^*) de la FC en pols depenia significativament ($P < 0,05$) de la concentració d'àcid nicotínic, fonamentalment quan la dosi era de l'1 i el 2 %. Aquestes mostres eren més clares que les control i les que tenien concentracions inferiors de nicotínic. Pel que fa a l'evolució de L^* en el temps, també es va observar una variació significativa ($P < 0,05$) durant l'emmagatzematge i, al cap dels 2 mesos, la lluminositat de les diferents mostres era lleugerament inferior a la que presentaven just acabades de deshidratar, però les additivades amb un 1-2 % seguien sent més clares que la resta després d'aquest temps.

D'altra banda, la concentració d'àcid nicotínic tenia efectes significatius ($P < 0,05$) sobre les coordenades vermella (a^*) i groga (b^*) del concentrat d'Hb en pols. També es va trobar que el temps d'emmagatzematge tenia efectes significatius sobre l'evolució d'ambdós paràmetres i que la seva variació depenia de la concentració afegida. Durant els primers 5-7 dies després de la deshidratació, aquests paràmetres disminuïen d'una forma més marcada i, a partir de la primera setmana, la disminució de a^* era més progressiva, mentre que b^* es mantenia força estable. Les mostres amb un 2 % de nicotínic presentaven valors de a^* (28) molt superiors que els de les mostres control i la resta de concentracions (23-24), però no diferien gaire de les que tenien un 1 % (25-26). Al cap de 63 dies, les mostres amb un 2 % de nicotínic presentaven valors de a^* de 23, unes 5-6 unitats superiors a la resta (17), mentre que respecte de les additivades amb un 1 % (19), la diferència era d'un 4 unitats. D'altra banda, en el cas de la coordenada groga (b^*), l'addició d'un 2 % de nicotínic determinava que les mostres fossin unes 2-3 unitats més grogues (18) que les que contenien un 1 % (16,5), i les que tenien un 0,25-0,5 % de l'additiu i les control (15,5). Al final de l'emmagatzematge, la coordenada groga havia disminuït lleugerament, aproximadament 1 unitat, per a totes les concentracions.

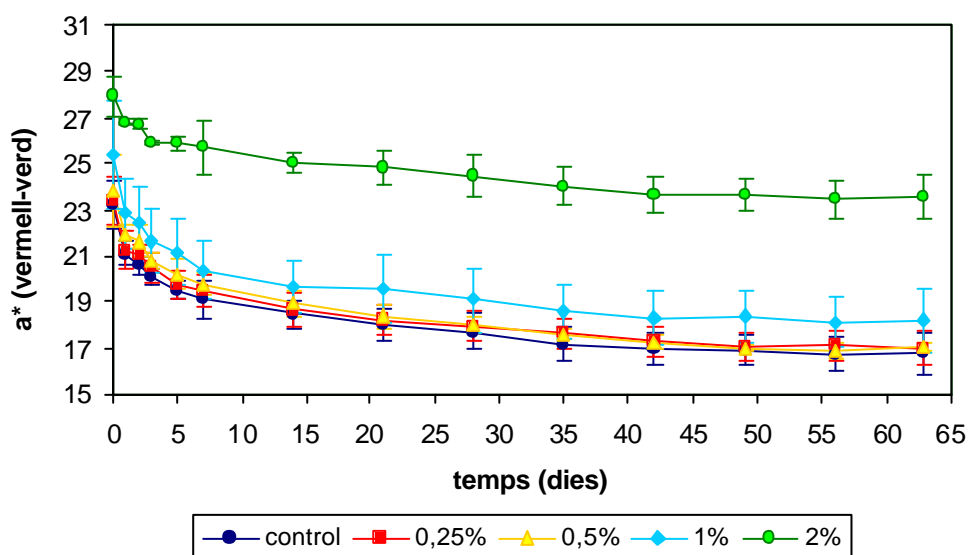


Figura 3.14: Evolució del paràmetre a^* (vermell-verd) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid nicotínic. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

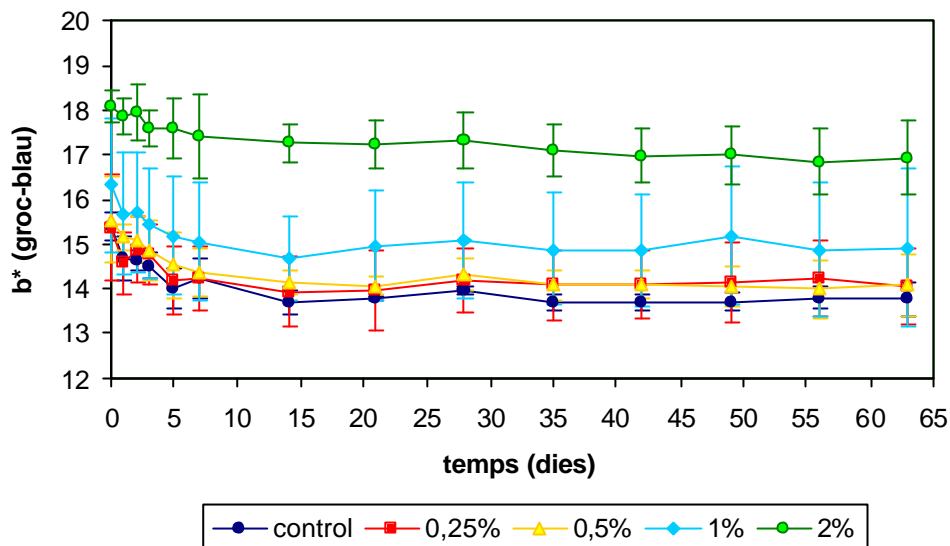


Figura 3.15: Evolució del paràmetre b^* (groc-blau) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració d'àcid nicotínic. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

L'addició d'un 2 % (p/v) d'àcid nicotínic a la FC evita considerablement l'enfosquiment produït per la deshidratació i l'emmagatzematge posterior, i permet l'obtenció d'una pols de FC més clara, més vermella i més groga que la FC control. L'increment d'ambdues coordenades cromàtiques (a^* i b^*) es tradueix en què la pols tingui un color marronós a causa de l'augment de b^* . Tal com s'ha comentat anteriorment, el comportament del paràmetre b^* sol ser força similar al del paràmetre a^* (Pérez-Álvarez *et al.*, 1998). Tanmateix, l'àcid nicotínic a aquesta concentració és capaç d'estabilitzar el poder colorant del concentrat d'Hb en pols durant el període d'emmagatzematge. L'àcid nicotínic es va patentar per utilitzar-lo com a estabilitzant del color en carns; Coleman *et al.* (1949, 1951; Kendrick i Watts, 1969) van descriure la formació d'un pigment de color vermell, producte de la reacció entre l'àcid nicotínic i la Mb. Està descrit que l'àcid nicotínic i la seva amida formen un complex vermell estable amb la Mb, similar al que es forma amb NO (Cheftel i Cheftel, 1976).

Donat que l'addició d'un 2 % de nicotínic tenia efectes molt favorables sobre el color de la FC en pols, es va intentar optimitzar la dosi òptima d'aquest i es van assajar les concentracions de 0; 1,5; 2 i 2,5 %. Tanmateix, l'addició d'un 2,5 % de nicotínic produïa una disminució del pH, que repercutia negativament sobre les característiques cromàtiques i la solubilitat de l'Hb de la FC. Per tant, es va decidir assajar els efectes de l'addició de nicotinamida a la FC a concentracions de l'1; 1,5; 2 i 2,5 %.

3.4.6 Efecte de l'addició de nicotinamida

La nicotinamida s'obté a partir de l'àcid nicotínic substituint el grup àcid d'aquest per un grup amida. La nicotinamida, en forma de nicotinamida adenina dinucleòtid (NAD⁺) o la seva forma fosforilada (NADP⁺) és un coenzim de deshidrogenases (Belitz i Grosch, 1999). A les Figures 3.16, 3.17 i 3.18 es mostren els valors dels paràmetres L*a*b* en funció de la concentració de nicotinamida afegida a la FC i la seva evolució durant l'emmagatzematge. Les diferents concentracions de nicotinamida tenien un efecte significatiu sobre els 3 paràmetres del color. També es va observar que l'evolució de L*, a* i b* durant l'emmagatzematge depenia significativament de la mostra de FC en pols, a causa de la variabilitat entre les repeticions.

Pel que fa a la Luminositat, existia un efecte significatiu ($P < 0,05$) de la concentració, així com una variació significativa d'aquest paràmetre durant el període d'emmagatzematge. El valor de L* disminuïa durant els primers dies i després s'estabilitzava. Les mostres amb nicotinamida eren més clares que les control, malgrat que l'increment de la lluminositat era superior amb una concentració del 2,5 %. Aquest comportament és molt similar a l'observat amb un 1 % d'àcid nicotínic.

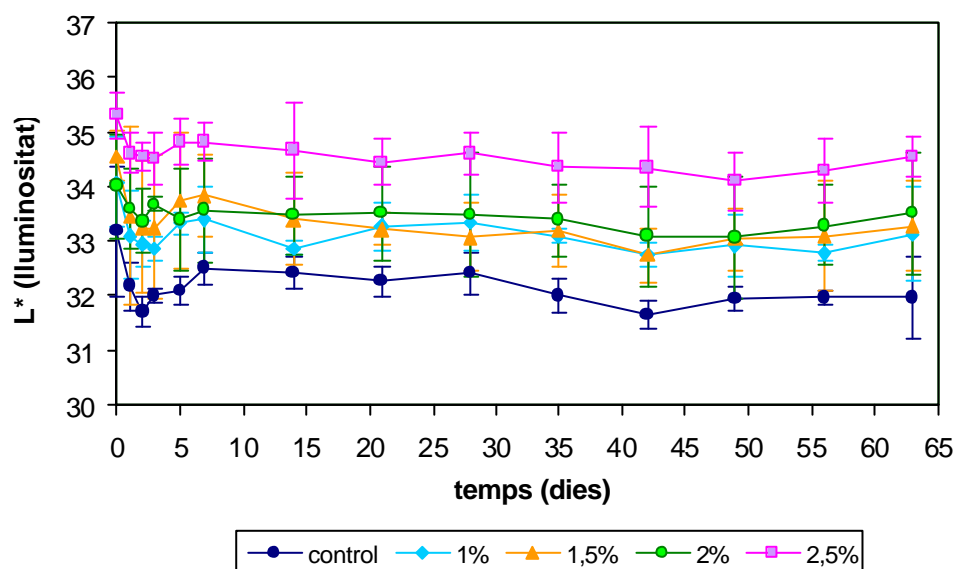


Figura 3.16: Evolució del paràmetre L* (lluminositat) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de nicotinamida. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

En referència al paràmetre a*, aquest era significativament superior ($P < 0,05$) en augmentar la concentració de nicotinamida. Tanmateix, els valors de la coordenada a* eren molt semblants entre les mostres additivades amb concentracions de 1,5, 2 i 2,5 %. Existia una variació significativa del paràmetre a* durant el període d'emmagatzematge i la pauta de variació depenia de la concentració afegida. La coordenada vermella del color

de la FC disminuïa ràpidament durant la primera setmana i després més lentament. Alguns autors han descrit que la nicotinamida té capacitat de formar complexos amb el grup hemo, incrementant els valors de a^* (Ahn i Maurer, 1990). Tanmateix, la nicotinamida presenta una menor capacitat d'evitar l'oxidació del Fe que l'àcid nicotínic. Pot ser que la naturalesa àcida d'aquest últim sigui responsable del millor comportament segrestant per part del nicotínic. Segons Maccarrone *et al.* (1987), l'addició d'antioxidants i àcids poden millorar el color d'alguns productes després de sotmetre'ls a un tractament.

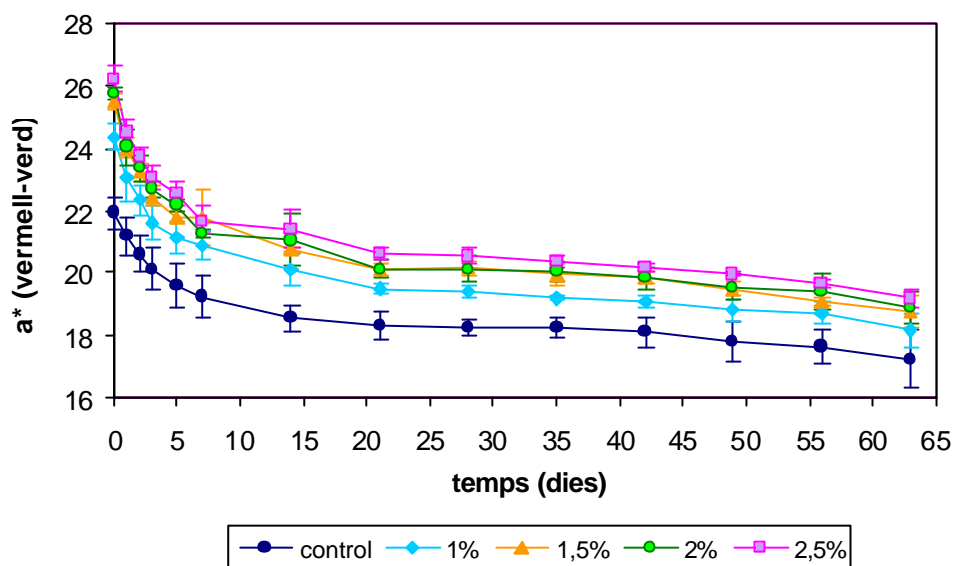


Figura 3.17: Evolució del paràmetre a^* (vermell-verd) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de nicotinamida. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

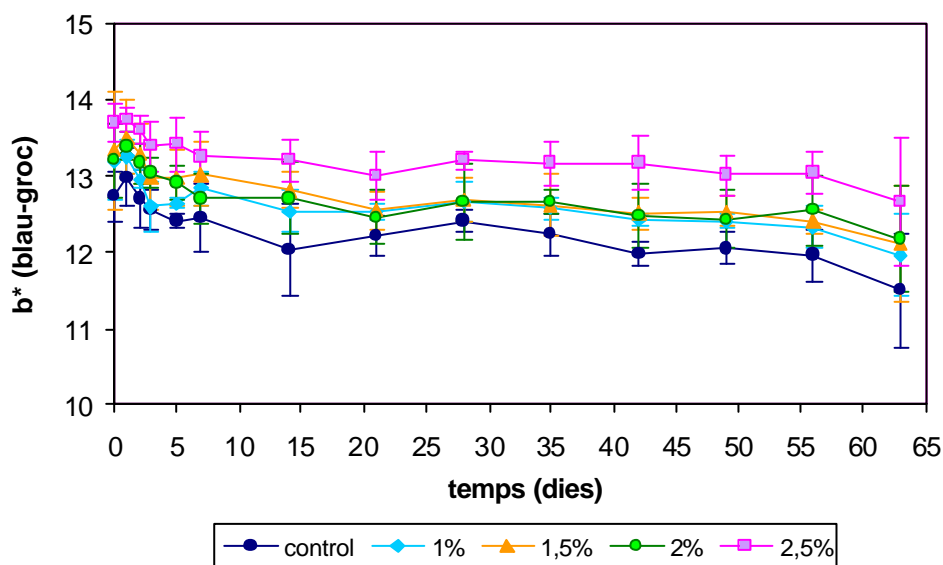


Figura 3.18: Evolució del paràmetre b^* (groc-blau) en el temps del concentrat d'Hb en pols en funció de la concentració de nicotinamida. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

Per una altra banda, la concentració i el temps d'emmagatzematge també tenien efectes significatius ($P < 0,05$) sobre el paràmetre b^* . La coordenada groga era lleugerament superior en incrementar la dosi de nicotinamida. En totes les concentracions, la variació de b^* en el temps era molt similar, durant els primers 15 dies es produïa un descens lleuger, després es mantenia bastant estable i, a partir de l'última setmana, tornava a disminuir. Al final del període d'emmagatzematge, les mostres amb un 2,5 % de nicotinamida presentaven una tonalitat groga més elevada que la resta.

De forma global, hem observat que l'addició de nicotinamida a la FC fa que el grup hemo sigui menys susceptible a l'oxidació produïda tant durant la deshidratació com durant el període d'emmagatzematge. Els resultats més positius s'han obtingut amb l'addició d'un 2,5 %, sobretot quant a la lluminositat, perquè s'obté una pols molt més clara i més vermella, però a la vegada més groga i, això es tradueix en un color marronós. Tanmateix, amb l'addició d'un 2 % d'àcid nicotínic s'obtenien valors molt més elevats de la coordenada vermella i, per tant, una protecció més eficaç enfront de l'enfosquiment produït durant la deshidratació i l'emmagatzematge de la pols.

3.5 CONCLUSIONS

De l'estudi del possible efecte estabilitzant del color de la FC deshidratada per atomització mitjançant l'addició d'additius amb activitat potencialment reductora i/o segrestant del ferro hemínic, s'ha observat que només l'addició d'àcid ascòrbic o glucosa i l'àcid nicotínic i la nicotinamida, té efectes positius sobre el color del producte en pols.

En tots els assaigs realitzats s'observen canvis de color en la FC, provocats pel tractament de deshidratació, que són característics de l'oxidació de l'Hb. A més, durant els 2 mesos d'emmagatzematge, el color segueix evolucionant i s'aprecia un augment progressiu de l'enfosquiment i la tonalitat marró.

L'àcid ascòrbic i la glucosa no milloren la conservació del color de l'Hb, modifiquen els paràmetres a^* i b^* , però disminueixen l'enfosquiment que es produeix durant la deshidratació per atomització, amb la qual cosa, es pot obtenir un producte en pols de color marró més clar que sense l'addició d'aquests antioxidants. Al final del període d'emmagatzematge, les mostres additivades amb un 2 % d'ascòrbic o un 12 % de glucosa són més clares que la FC control.

L'addició de dextrina o L-cisteïna no disminueix l'enfosquiment que es produeix durant la deshidratació de la FC ni evita el canvi de color de l'Hb. L'efecte de les diferents concentracions de dextrina no produeix variacions significatives en cap dels 3 paràmetres del color de la FC en pols, donat que aquests disminueixen durant el temps

d'emmagatzematge, sense que existeixi una relació entre les diferents concentracions de dextrina. D'altra banda, la cisteïna, no només no protegeix a la FC de l'enfosquiment, sinó que produeix una disminució de les tonalitats vermella i groga de la pols, que és proporcional a la concentració de cisteïna.

Per últim, l'àcid nicotínic i la nicotinamida protegeixen el color de l'Hb durant el procés de deshidratació i el període d'emmagatzematge de la FC en pols. L'addició d'un 2 % d'àcid nicotínic a la FC evita considerablement l'enfosquiment produït per la deshidratació i l'emmagatzematge posterior i permet l'obtenció d'una pols de FC més clara, més vermella i més groga que la FC control. Per altra banda, es va trobar que la FC additivada amb un 2,5 % de nicotinamida, també era menys susceptible a l'enfosquiment o canvi de color produït tant durant la deshidratació com durant el període d'emmagatzematge.

Finalment, malgrat que s'han observat efectes positius sobre la lluminositat amb els antioxidants àcid ascòrbic i glucosa i sobre la tonalitat vermella amb els quelants àcid nicotínic i nicotinamida, no es descarta la utilització combinada de varis additius per protegir el color de la FC en pols d'una forma més eficaç. Es podrien afegir diferents reductors o una combinació d'aquests amb agents segrestants, per exemple l'àcid ascòrbic o la glucosa, que produeixen un aclariment de la pols, en combinació amb àcid nicotínic o nicotinamida, que protegeixen el color vermell, per investigar si existeixen efectes sinèrgics o complementaris entre aquestes substàncies.

Capítol 4: Higienització de la fracció cel·lular mitjançant el tractament amb altes pressions hidrostàtiques.

4.1 INTRODUCCIÓ

Com hem vist anteriorment, l'elevada contaminació microbiològica de la sang és la principal limitació per a la utilització de les fraccions de la sang a la indústria alimentària. Per millorar la qualitat microbiològica de les fraccions de la sang és necessari trobar un mètode de descontaminació o higienització efectiu que permeti mantenir el valor nutritiu i les propietats organolèptiques i funcionals d'aquests productes. Donat que els tractaments tèrmics modifiquen o danyen irreversiblement la fracció cel·lular i les seves proteïnes, es requereix un mètode de conservació no tèrmic. Tal com s'ha descrit en el capítol 2, la deshidratació per atomització és un bon sistema per conservar la FC de la sang de porc. Tanmateix, la FC deshidratada per atomització encara reflecteix l'elevada contaminació microbiològica del producte de partida. Es planteja, doncs, l'aplicació d'un sistema d'higienització, prèviament al procés de deshidratació, que permeti reduir la microbiota contaminant de la FC.

Les tecnologies no tèrmiques de conservació dels aliments estan emergent com a processos alternatius o complementaris als mètodes tradicionals de conservació dels aliments. Els diferents tractaments no tèrmics de conservació dels aliments (altes pressions hidrostàtiques, camps elèctrics polsants d'elevada intensitat, camps magnètics oscil·lants, polsos de llum d'elevada intensitat, microfiltració tangencial, radiacions ionitzants, llum ultravioleta d'ona curta, ultrasons, processos combinats basats en la teoria dels obstacles, entre d'altres) permeten obtenir productes estables des del punt de vista microbiològic, sense que es produeixin els efectes col·laterals negatius dels tractaments de conservació amb aplicació de calor sobre les qualitats nutritives i sensorials dels aliments. L'alta pressió hidrostàtica està guanyant importància a la indústria alimentària a causa dels avantatges que presenta en la inactivació de microorganismes i enzims i en la producció d'aliments d'alta qualitat (Mertens i Knorr, 1992, a: Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998).

Altes pressions hidrostàtiques

El processament dels aliments per alta pressió hidrostàtica (HHP), també anomenat processament per alta pressió (HPP) o per pressió ultra elevada (UHP), és una tecnologia emergent que resulta molt interessant com a alternativa als processos tèrmics de conservació. Consisteix en sotmetre als aliments a pressions compreses entre 100 i 1000 MPa, les quals provoquen la destrucció i/o la inactivació dels microorganismes patògens

i/o deteriorants, la modificació de biomolècules i la inactivació o activació enzimàtica. Les condicions d'aplicació dels tractaments HHP solen ser de 0°C fins a 100°C de temperatura, durant intervals de temps que oscil·len des de polsos de pocs segons fins a tractaments de més de 20 minuts de durada.

Els efectes dels tractaments HHP es basen en diferents principis físics (Cheftel, 1992; Heremans, 1992, a: Tewari *et al.*, 2001; Knorr, 1993):

- a) El principi de Le Chatelier, que estableix que qualsevol fenomen que comporta una disminució del volum es veu afavorit per un increment de pressió i viceversa. Per tant, l'alta pressió afecta a qualsevol fenomen que comporti un canvi de volum i afavoreix els fenòmens que tenen com a resultat una disminució del volum (reaccions químiques, canvis de fase, canvis en la configuració molecular).
- b) El principi de Pascal, que indica que la pressió actua isostàticament, és a dir, que es transmet de forma uniforme i quasi instantània a través de tot el producte alimentari, independentment de la seva grandària, volum, geometria, forma i composició, sempre i quan la mostra estigui en contacte directe amb el medi transmissor de la pressió, o hermèticament segellat en un envàs flexible que transmeti la pressió. La presència de gas (aire) a l'interior fa que la transmissió de la pressió no sigui instantània.
- c) El principi d'ordenació microscòpica, que implica que, a temperatura constant, un increment de la pressió incrementa el grau d'ordenació de les molècules d'un substrat.

Adicionalment, a diferència dels tractaments tèrmics, el temps necessari pels tractaments HHP és independent de la massa i la grandària de les mostres, de manera que permeten reduir el temps de processat (Zimmerman i Bergman, 1993, a: Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998) i els requeriments energètics també són menors.

Efectes de l'alta pressió

La conservació dels aliments mitjançant els tractaments HHP està basada en diferents efectes de la pressió sobre els sistemes biològics com per exemple: la permeabilitat i la funcionalitat de la membrana de les cèl·lules, la morfologia cel·lular, les reaccions bioquímiques i els mecanismes genètics dels microorganismes (Hoover *et al.*, 1989; Hoover, 1993). La membrana cel·lular és la part dels microorganismes que es veu afectada en primer terme (Morita, 1975). Aquesta, després de la pressurització, normalment mostra alterada la seva permeabilitat al modificar-se la capa de fosfolípids, fet que provoca des de danys subletals a les cèl·lules supervivents fins a la lisi cel·lular. La morfologia cel·lular també es pot veure afectada a partir de 6 atmosferes, ja que el gas intracel·lular de les vacuoles pot col·lapsar a aquesta pressió (Knorr, 1995).

Quant a les reaccions bioquímiques, l'aplicació de pressió afavoreix les reaccions que provoquen una disminució de volum i retarda les que comporten un increment d'aquest. Respecte als mecanismes genètics, la pressió afecta als enzims implicats en la replicació i la transcripció, mentre que els àcids nucleics presenten una gran estabilitat enfront la pressió i són més baroresistents que les proteïnes.

Donat que la pressió no afecta als enllaços covalents, els components de baix pes molecular dels aliments com les vitamines, els colorants i els *flavours* no es veuen afectats per la pressió i, per tant, el valor nutritiu i les característiques organolèptiques dels productes tractats per HHP es solen mantenir força intactes. Tanmateix, l'alta pressió actua sobre les interaccions no covalents que estableixen l'estructura de les molècules biològiques (com els ponts d'hidrogen i les interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques) i, com a conseqüència, pot induir canvis conformacionals en les proteïnes i els polisacàrids (midó, pectines, alginats, etc.) com per exemple la desnaturalització i l'agregació proteica o la formació de gels de proteïnes i la gelificació del midó (Van Camp, 1996). També està descrit que l'exposició a alta pressió pot inactivar o activar les reaccions enzimàtiques deteriorants. La inactivació enzimàtica està influenciada pel pH, concentració de substrat, estructura de les subunitats de l'enzim, i la temperatura i el temps de pressurització (Hoover *et al.*, 1989).

Equips d'alta pressió

Actualment els equips industrials d'alta pressió hidrostàtica consisteixen en instal·lacions discontinües d'entre 10 i 500 L de capacitat, per a aliments líquids, fluids viscosos, sòlids o amb ingredients sòlids, o sistemes semicontinuos de 1 a 4 t/h de producció, aptes només per a productes líquids.

A la Figura 4.1 es mostra un esquema d'un equip discontinu per al tractament HHP que consta d'una cambra cilíndrica de pressurització (1), una bomba de baixa pressió (2), un intensificador de la pressió (3) que utilitza el líquid des de la bomba de baixa pressió per generar un fluid transmissor d'alta pressió, el medi transmissor de la pressió (4) que sol ser aigua o solucions etanòliques (per si s'ha de treballar a baixes temperatures), i un circuit de refrigeració o calefacció extern (5). El processament HHP es porta a terme normalment mitjançant líquids de baixa compressibilitat, generalment aigua amb un petit percentatge d'oli soluble per lubricar la bomba i per evitar corrosions. La pressió és generada amb una bomba hidràulica i el líquid pressuritzat queda retingut a l'interior de la cambra cilíndrica de tractament de gran espessor i resistència, on es produeix la pressurització del producte (Cheftel, 1992).

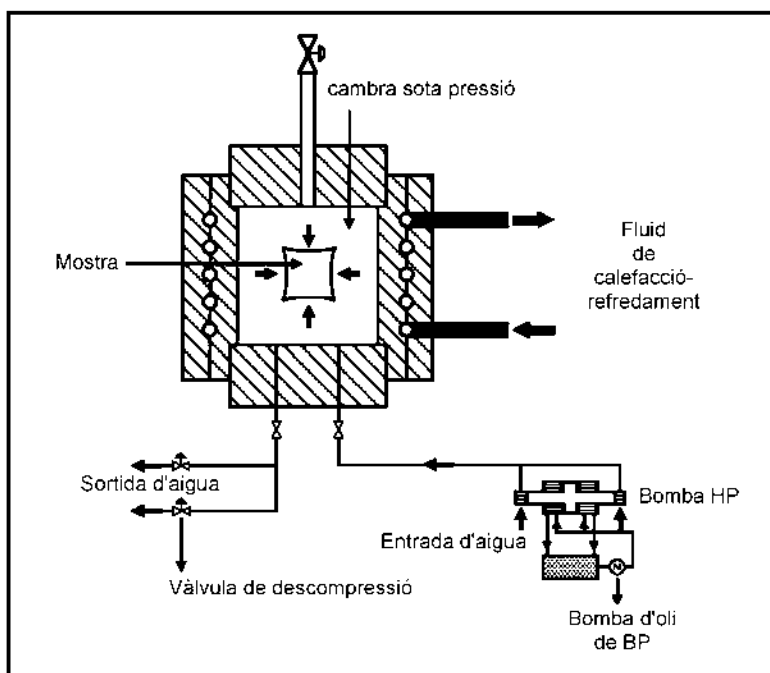


Figura 4.1: Esquema d'un equip discontinu d'alta pressió hidrostàtica.

El nostre grup de recerca ha portat a terme diversos estudis dels efectes del processament amb altes pressions hidrostàtiques sobre la contaminació microbiològica i la funcionalitat proteica de la fracció plasmàtica de la sang de porc (Parés, 1998; Parés *et al.*, 1998a; Parés *et al.*, 2000; Parés *et al.*, 2001). A partir d'aquests estudis, es va arribar a la conclusió que l'aplicació de tractaments HHP a 450 MPa durant 15 min a temperatures superiors a 25°C era un mètode efectiu per millorar la qualitat microbiològica del plasma de porcí. La pressurització realitzada a 40°C durant 15 min era la que presentava una major efectivitat sobre la reducció dels recomptes microbiològics del plasma. Pel que fa a la funcionalitat, els tractaments realitzats a 450 MPa i a 40°C produïen una disminució de la solubilitat al pH natural de les proteïnes del plasma (pH 7,4) però milloraven l'activitat emulsionant, l'estabilitat de l'escuma i les propietats funcionals dels gels de plasma obtinguts per escalfament. Per altra banda, els tractaments realitzats en condicions de refrigeració (5°C) no afectaven la solubilitat ni les propietats de superfície de les proteïnes del plasma.

4.2 OBJECTIUS

Els objectius del present capítol són, en primer terme, posar a punt el tractament d'altres pressions hidrostàtiques per aplicar-lo a la higienització de la fracció cel·lular de la sang de porc. Amb aquesta finalitat, s'avaluaran els efectes del tractament per HHP a diferents

condicions de pressió (400, 450 i 500 MPa), temperatura (5, 20 i 40°C) i temps (5, 15 i 30 min) sobre la qualitat microbiològica, així com sobre algunes característiques funcionals de la FC com la solubilitat proteica, la viscositat i el color.

Un cop fixades les millors condicions de pressió, temperatura i temps d'aplicació del tractament HHP a la FC, es determinaran les propietats funcionals de la FC higienitzada per altes pressions hidrostàtiques i deshidratada per atomització. Concretament, s'avaluaran l'activitat emulsionant, la capacitat escumant i de formació de pastes per escalfament, així com la textura i la capacitat de retenció d'aigua de les pastes obtingudes a partir de la FC sotmesa als dos processos tecnològics. S'ha plantejat estudiar la funcionalitat de la FC sotmesa a una pressurització i posteriorment conservada mitjançant la deshidratació per atomització, donat que la forma viable d'una possible industrialització i utilització de la fracció cel·lular seria com un producte en pols.

4.3 MATERIAL I MÈTODES

4.3.1 Procedència de les mostres

Es van utilitzar mostres de sang de porc recollides del tanc d'emmagatzematge en refrigeració d'un escorxador industrial de característiques descrites al capítol 2 (apartat 2.3.2). Les mostres de fracció cel·lular hemolitzada es van obtenir segons el procediment descrit a l'apartat 2.3.3 del capítol 2. Tots els experiments es van realitzar amb mostres de sang recollides en diferents dies però en les mateixes condicions. Les mostres de fracció cel·lular hemolitzada sempre es van pressuritzar el dia següent d'haver recollit la sang i es mantenien en refrigeració en ampolles de vidre estèrils fins al moment del tractament d'higienització.

4.3.2 Tractament amb altes pressions hidrostàtiques

Els tractaments de HHP es van realitzar en una premsa isostàtica discontinua (Alstom, Nantes, França) situada al Centre Especial de Recerca-Planta de Tecnologia dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, que disposa d'una cambra de pressurització de 2 L de capacitat, de 10 cm de diàmetre i 25 cm d'alçada. Es van utilitzar bosses de plàstic PA/PE flexibles de 250 x 500 mm (Cryovac Packaging Spain S.L., Barcelona), en les quals es van introduir uns 250 mL de FC hemolitzada (Figura 4.2). Les bosses es tancaven intentant no deixar bombolles d'aire a l'interior ja que aquestes disminueixen l'eficàcia del tractament, s'introduïen en una altra bossa de les mateixes característiques i es termosegellaven al buit. Les diverses

condicions dels tractaments HHP aplicades foren 400, 450 i 500 MPa, a 5, 20 i 40°C durant 5, 15 i 30 minuts.

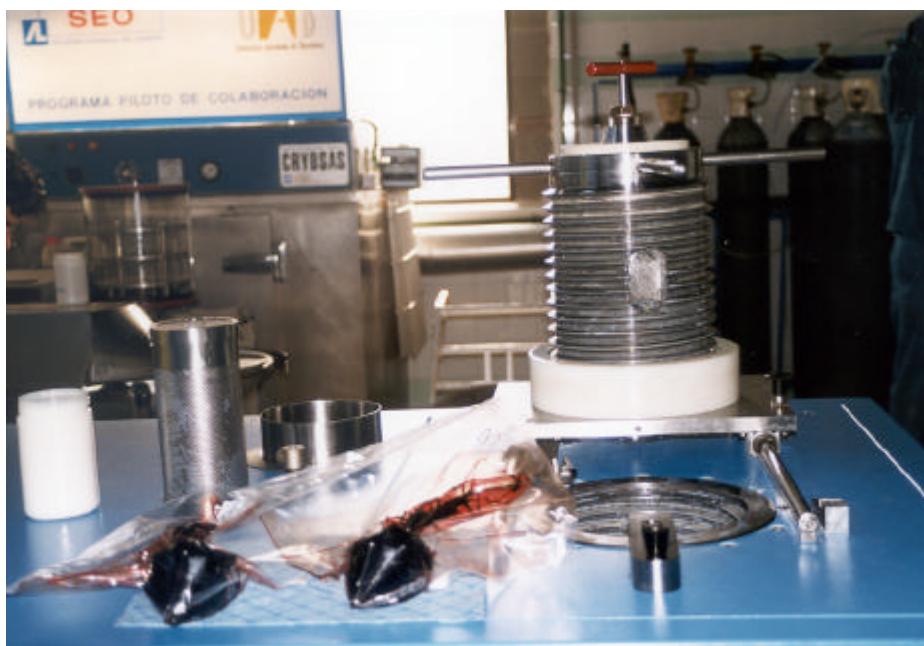


Figura 4.2: Mostres de fracció cel·lular hemolitzada envasades abans del tractament HHP i detall del cilindre de pressurització de la premsa isostàtica discontinua utilitzada.

Aquest equip permet aplicar pressions de fins a 500 MPa; la pressió s'assoleix en un període de temps d'entre 1 i 2 minuts i, al final del cicle, la descompressió s'aconsegueix en 40-90 segons. La durada dels períodes de compressió i descompressió sempre era la mateixa en tots els tractaments. La temperatura de l'aigua a l'interior de la cambra de pressurització era mesurada amb una termosonda per controlar si es produïen variacions de la temperatura durant els tractaments. La temperatura màxima assolida durant els tractaments va ser d'uns 2°C per sobre de la temperatura programada.

La temperatura de tractament s'assolia mitjançant el bescanvi de calor a través de la doble camisa de la cambra de pressurització, per on es feia circular aigua provinent d'un bany en els tractaments realitzats a 20 i 40°C, o bé una barreja d'etanol i aigua (3:1), com a fluid refrigerant, en els tractaments realitzats a temperatures de refrigeració (5°C), per evitar la possible cristallització de l'aigua durant el període de descompressió. El líquid transmissor de la pressió a l'interior de la cambra era una emulsió d'oli en aigua (10 % d'oli) per a mantenir la bomba lubricada. Es va utilitzar un oli soluble Dromus Oil B (Shell Espanya, Madrid). Les mostres que s'havien de tractar a 20 i 40°C, un cop envasades, es deixaven a temperatura ambient, i les que s'havien de tractar a 5°C es mantenien en refrigeració fins al moment del tractament.

Les mostres no tractades i totes les mostres després dels tractaments HHP es van mantenir a 5°C fins que es realitzaven les anàlisis corresponents i aquest temps oscil·lava entre 2 i 4 hores.

4.3.3 Contaminació microbiològica

Per avaluar l'efecte de l'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre la qualitat microbiològica de la FC de la sang de porc es va determinar la capacitat de reducció de la contaminació general per part del tractament d'higienització i la capacitat de creixement de la població supervivent després del tractament. Les anàlisis microbiològiques es realitzaven el mateix dia en què les mostres es sotmetien als tractaments d'alta pressió.

4.3.3.1 Recompte de microorganismes aerobis mesòfils

Per avaluar la capacitat de reducció de la contaminació microbiològica de la FC per part del tractament HHP es van determinar els recomptes dels microorganismes aerobis mesòfils en les mostres no tractades i en les mostres pressuritzades. Les determinacions microbiològiques es van fer pel mètode de la sembra en massa, sembrant 1 mL de les dilucions corresponents en el medi de cultiu de recompte general no selectiu Base Agar Sang (Oxoid Ltd.) descrit al capítol 2 (apartat 2.2.5.1). Les plaques s'incubaven en una estufa de cultiu a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 24 hores i posteriorment es realitzava el recompte de les colònies crescudes.

4.3.3.2 Capacitat de creixement de la microbiota contaminant

Per avaluar de forma més acurada la capacitat d'higienització de les altes pressions sobre la FC es va determinar l'efecte del tractament HHP sobre el creixement de la població microbiana després de la pressurització. D'aquesta manera es podia avaluar la capacitat de creixement dels microorganismes supervivents als diferents tractaments HHP, donat que alguns microorganismes poden ser danyats o inhibits per les altes pressions, però en condicions favorables es poden recuperar. Aquests microorganismes probablement no creixen en el medi de cultiu Base Agar Sang i, per aquest motiu, es va avaluar l'evolució de la microbiota contaminat a la FC higienitzada pel tractament HHP respecte la de les mostres control.

L'evolució de la càrrega microbiològica contaminat de la FC higienitzada per alta pressió i de la FC no tractada es va determinar mitjançant un mètode turbidimètric. La turbidimetria és un mètode ràpid per a la detecció i el recompte de microorganismes, basat en mesures de la densitat òptica que representen el desenvolupament de la població

bacteriana en temps real, donat que quan els microorganismes creixen i es multipliquen en un medi líquid fan augmentar la seva terbolesa, de manera que l'absorbància serà proporcional a la concentració de microorganismes.

Es va utilitzar un analitzador microbiològic turbidimètric Bioscreen C (Labsystems Corporation, Helsinki, Finlàndia) que és un espectrefotòmetre que permet processar lectures verticals d'un gran nombre de mostres líquides disposades en plaques multipouets. Les corbes de creixement de la microbiota supervivent es van obtenir mesurant les variacions de l'absorbància a 600 nm cada 20 minuts, sobre alíquotes de 200 µL d'una dilució 1/200 de FC en Brou Nutritiu ^{M.5} (Oxoid Ltd.), de les mostres incubades a 31°C durant 132 hores. Es van utilitzar plaques de 100 pouets i es realitzaren quatre repeticions per a cadascuna de les mostres estudiades per obtenir les corbes de creixement mitjanes de la població. La capacitat de creixement dels microorganismes supervivents de la FC es va avaluar comparant la velocitat de creixement (que es va calcular a partir dels pendents de la fase de creixement exponencial linearitzada mitjançant la transformació en logaritmes neperians) i el temps de generació (calculat com el Ln 2/pendents) de la microbiota supervivent a les mostres pressuritzades i a les no tractades.

4.3.4 Color CIE L*a*b*

Per avaluar l'efecte de les altes pressions sobre el color de la FC es van determinar els canvis produïts sobre els paràmetres CIE L*a*b* del color. Donat que la FC és un fluid opac, la determinació de les coordenades cromàtiques es va realitzar amb un colorímetre Minolta CR-300 amb un conus de projecció de vidre segons la metodologia descrita a l'apartat 2.2.6.2. Es van dur a terme tres mesures dels paràmetres CIE L*a*b* sobre cada mostra.

4.3.5 Solubilitat proteica

Es determinà la solubilitat proteica a pH neutre (7) i a pH àcid (4,5) de la FC, com el percentatge de proteïna soluble respecte el percentatge de proteïna total segons el mètode de Morr *et al.* (1985).

^{M.5} :	Brou Nutritiu (NB, Oxoid CM 1)	composició (g·L ⁻¹)
	pH: 7,4 ± 0,2	
		Pols "Lab-Lemco" 1,0
		Extracte de llevat 2,0
		Peptona 5,0
		Clorur sòdic 5,0

La determinació de la solubilitat de cada mostra es va fer per duplicat, en solucions de FC al 4 % (p/v), una es va ajustar a pH 4,5 i l'altra a pH 7, segons el mateix procediment descrit a l'apartat 2.2.4.2. Cada determinació es va fer individualment per duplicat sobre cada mostra.

4.3.6 Viscositat

Per determinar la viscositat es va utilitzar un viscosímetre-reòmetre rotacional de cilindres concèntrics Bohlin Visco 88 BV (Bohlin Instruments Ltd., Cirencester, Anglaterra). Les mesures de viscositat es realitzaren amb 15 mL de les mostres FC que prèviament havien estat temperades a 25°C. Donat que la FC presentava una viscositat intermèdia (entre 70 i 600 mPa·s) es va utilitzar com a sistema de mesura la combinació d'èmbol mòbil (cilindre rotacional intern) i cilindre fix (extern) de 25 mm i 27 mm de diàmetre, respectivament. Es va treballar a una velocitat de rotació de 327 rpm (5,45 Hz) i es comprovava que el sistema de mesura i la velocitat rotacional permetessin que el parell de torsió sempre estigués comprès entre 0,5 i 9,5 mN·m. La viscositat es va mesurar en Pascal*segons amb un gradient de deformació o cisalla (*shear rate*) de 384 s⁻¹ i es van prendre quatre mesures consecutives de cada mostra.

4.3.7 Determinació de les propietats funcionals

Per determinar les propietats funcionals de la FC higienitzada per altes pressions hidrostàtiques es va dissenyar un experiment aleatoritzat per blocs complets. Aquest experiment es va dur a terme sobre 5 mostres de FC hemolitzada (5 repeticions) provinents de sang de porc, obtingudes en diferents dies però en les mateixes condicions. Cada mostra es va dividir en dos alíquotes d'uns 500 mL que es va envasar en ampolles flexibles de PE de baixa densitat (Bibby Sterilin Ltd., Anglaterra) sense deixar gens d'espai de cap. Una alíquota es va utilitzar com a control (FC no tractada) i l'altra es va sotmetre al tractament d'higienització amb HHP segons les millors condicions d'operació (Toldrà *et al.*, 2002) que es descriuen en la primera part d'aquest capítol. Ambdues mostres es van mantenir en refrigeració fins al moment de la deshidratació.

Les mostres de FC es van deshidratar per atomització en un equip de laboratori Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suïssa) a les següents condicions: temperatura d'entrada de l'aire de 140°C; cabal d'alimentació constant de 670 mL·h⁻¹; cabal d'aire d'aspiració de 60 L·h⁻¹; i 5 bar de pressió pel flux d'aire per a la polvorització. Les temperatures de sortida de l'aire mitjanes assolides durant el procés de deshidratació de les diferents mostres es mostren a la Taula 4.1. Les mostres de FC es van assecar el mateix dia que s'havien sotmès al tractament HHP.

Donat que l'aplicació del tractament HHP a la FC produïa un increment de la viscositat del producte, per tal de facilitar el procés de polvorització de la FC pressuritzada i evitar l'obtenció del broquet nebulitzador, es va fer una dilució en aigua per disminuir la seva viscositat. La FC pressuritzada es va deshidratar a una concentració d'extracte sec del 30 %, mentre que l'extracte sec de la FC control era del 35 %.

A la Taula 4.1 es mostren els continguts en humitat de les mostres de FC control i FC tractada per HHP després de la deshidratació per atomització a 140°C. La repetició número 3 es va deshidratar sota unes condicions d'elevada humitat relativa ambiental, les quals van disminuir la capacitat de deshidratació de l'equip i, com a conseqüència, aquesta mostra presentava un major % d'humitat i una menor T^a de sortida de l'aire. Tanmateix, el 5,27 % d'humitat d'aquesta mostra coincideix amb el valor assolit en les mostres de FC deshidratades amb l'altre equip de deshidratació per atomització utilitzat als experiments del capítol 2, el qual es corresponia a un contingut en aigua inferior al de la capa monomolecular. Per aquest motiu, no es va descartar aquesta repetició. El contingut en humitat de la FC control en pols era del 3,5 ± 0,7 % i el de la FC pressuritzada en pols del 3,23 ± 0,8 %; per tant, en ambdós tipus de mostres en pols, malgrat haver diluït una mica la FC tractada per alta pressió, s'assolia un contingut en aigua prou baix com per garantir la correcta conservació dels productes.

Taula 4.1: Percentatges d'humitat (g d'aigua per 100 g de pols) de les 5 mostres de FC no tractades (control) i pressuritzades deshidratades per atomització a 140°C i temperatures de sortida de l'aire durant la deshidratació.

Mostra	Humitat (%)		T ^a sortida aire (°C) ^a	
	FC control	FC + HHP	FC control	FC + HHP
Repetició 1	3,18	3,04	80,6 ± 0,9	80,1 ± 2,5
Repetició 2	3,92	3,59	74,8 ± 1,1	73,8 ± 1,7
Repetició 3	5,27	5,21	66,0 ± 3,0	66,5 ± 2,3
Repetició 4	3,03	1,98	77,6 ± 1,4	78,0 ± 2,0
Repetició 5	2,33	2,31	78,3 ± 0,9	78,1 ± 0,8

^a Mitjanes ± IC, n=8 (P=95%).

Es van determinar els efectes del tractament HHP i de la deshidratació per atomització sobre les propietats funcionals més interessants de la FC, comparant la funcionalitat de la FC pressuritzada i deshidratada amb la de la FC no tractada deshidratada. Les propietats funcionals estudiades van ser: la solubilitat proteica, l'activitat emulsionant, la capacitat escumant i l'estabilitat de l'escuma, la capacitat de retenció d'aigua i la textura de les pastes formades per escalfament de solucions de FC.

Paral·lelament a la realització d'aquest experiment, es van investigar els efectes de l'aplicació dels 2 processos tecnològics de conservació, el processament amb altes pressions i la deshidratació posterior, sobre el color i la qualitat microbiològica de la FC. De manera que es van determinar els recomptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC no tractada i la FC higienitzada per HHP, abans i després de la deshidratació per atomització (FC líquida i FC en pols reconstituïda al mateix extracte sec que la líquida, per descartar l'efecte de la concentració dels microorganismes al producte assecat), segons el procediment descrit a l'apartat 2.2.5.1. Els paràmetres CIE L*a*b* del color de la FC pressuritzada i la FC no tractada deshidratades per atomització es van determinar tal com s'ha descrit a l'apartat 2.2.6.2.

4.3.7.1 Solubilitat proteica

Es determinà la solubilitat proteica a pH neutre (7) i a pH àcid (4,5) de la FC, segons el mètode de Morr *et al.* (1985) descrit a l'apartat 2.2.4.2, a partir de solucions de FC en pols a l'1 % (p/v).

4.3.7.2 Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma

Les propietats escumants d'una proteïna es solen avaluar mitjançant la capacitat escumant, determinant el volum de l'escuma formada, i l'estabilitat de l'escuma, mesurant la pèrdua de volum que experimenta l'escuma en el temps.

Es va determinar la capacitat de formació d'escuma de la FC en pols tractada per HHP i no pressuritzada a pH 4,5 i a pH 7. La metodologia utilitzada consistia en preparar 200 mL d'una solució de FC al 0,5 % (p/v), ajustar al pH corresponent i introduir-la en un vas de precipitats de 1000 mL. La solució es va batre durant 10 minuts a velocitat màxima en un agitador Braun MultiMix M700 (Braun Espanyola S.A., Esplugues de Llobregat, Barcelona) amb dos braços batedors. Durant el batut, el recipient estava col·locat sobre un plat giratori fixat a un motor per aconseguir un moviment planetari que facilitava la formació d'una escuma homogènia. Un cop obtinguda l'escuma, es mesurava el volum d'escuma formada (mL) al cap d'un minut de repòs.

L'estabilitat de l'escuma formada amb les solucions de FC en pols tractada per HHP i no tractada, a pH 4,5 i a pH 7, es va determinar mitjançant un mètode gravimètric. Es dipositava una quantitat determinada i coneguda de l'escuma formada a cada pH sobre un colador d'acer inoxidable, sec i prèviament tarat, i es calculava el percentatge d'escuma que romanía retinguda al colador durant 2 hores, prenent mesures als 15, 30, 45, 60, 90 i 120 minuts, considerant que a temps inicial (t=0 min) l'estabilitat de l'escuma era del 100 %. Cada determinació es va fer per triplicat per a cada pH assajat.

4.3.7.3 Activitat emulsionant

L'activitat emulsionant a pH 4,5 i a pH 7 de la FC en pols tractada per HHP i no tractada es va determinar segons un mètode turbidimètric basat en la tècnica descrita per Pearce i Kinsella (1978). Es van preparar solucions de FC en aigua destil·lada a diferents concentracions (0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 i 2,5 % (p/v)). Les emulsions es van obtenir a partir de 20 mL d'oli de blat de moro en 60 mL de la solució de FC (emulsions al 75 %). La barreja es va emulsionar a 12.000 rpm durant 1 minut en un homogeneïtzador de ganivetes Polytron PT3000 (Kinematica AG, Littau, Suïssa). Es va mesurar l'absorbància a 500 nm en un espectrofotòmetre Shimatzu UV-160A (Shimatzu Corporation, Kyoto, Japó) d'una dilució de 100 µL de l'emulsió dispersada en 20 mL de dodecil sulfat sòdic (SDS, Panreac Química S.A., Montcada i Reixac, Barcelona) al 0,1 % (dilució 1:200), immediatament després d'homogeneïtzar, utilitzant com a blanc la solució de SDS al 0,1 %. Cada determinació es va fer per duplicat per a cada pH assajat.

4.3.7.4 Formació de pastes per escalfament

a) Preparació de les pastes:

Les pastes es van preparar a partir de FC en pols tractada per HHP i no tractada, reconstituïda al mateix extracte sec que la FC líquida i diluïda a la meitat en aigua destil·lada (dilució 1/2), per obtenir una solució de FC al 17 % d'extracte sec. De cada mostra es van preparar 2 solucions de FC, una es va ajustar a pH 4,5 i l'altra a pH 7. Les solucions es van introduir en una tripa de material sintètic (WP 2350/84, Proveedora Hispano Holandesa S.A., Barcelona) de 25 mm de diàmetre i d'uns 15-20 cm de llargada, per obtenir uns cilindres homogenis. Les pastes cilíndriques es van formar per escalfament de les mostres embotides a 80°C en un bany d'aigua durant 30 minuts. Posteriorment es refredaven en un bany d'aigua freda i es guardaven en refrigeració fins l'endemà, que era quan es realitzaven les anàlisi de textura i de la capacitat de retenció d'aigua corresponents.

b) Capacitat de retenció d'aigua de les pastes (CRA)

La capacitat de retenció d'aigua de les pastes de fracció cel·lular es va determinar mitjançant una tècnica basada en sotmetre les pastes a una centrifugació combinada amb filtració, desenvolupada per Kocher i Foegeding (1993) amb algunes modificacions proposades per Parés *et al.* (1998b).

A partir de les pastes de FC, obtingudes segons el protocol descrit al començament d'aquest apartat, s'obtenien uns cilindres de 8 mm de diàmetre amb un trepà. Els cilindres de pasta es col·locaven a l'interior d'unes bossetes de material filtrant *Goretex*[®] (Gore-Tex

W.L., Gore y Asociados S.L., Barcelona) de 20 x 50 mm, que permetien que l'aigua pogués sortir però al mateix temps no quedaven empapades. Les bossetes es subjectaven a uns tubs de centrifugació de manera que quedessin suspeses al seu interior sense tocar el fons del tub. Els tubs amb les bossetes es centrifugaven a 4000 x g (Sorvall RC-5C Plus, Dupont Co., Newton, Connecticut, U.S.A.) durant 10 minuts a 15-20°C. Després de la centrifugació es determinava la quantitat d'aigua alliberada pels cilindres de pasta de FC. Cada determinació es feia per triplicat per a cada pH assajat. La capacitat de retenció d'aigua s'expressava com el percentatge d'aigua retinguda (p/p), calculat per diferència del percentatge d'aigua alliberada per les mostres de pasta després de la centrifugació respecte el contingut en aigua inicial.

c) Textura de les pastes (TPA)

La textura fa referència a la manifestació de les propietats reològiques d'un aliment i es pot avaluar mitjançant mètodes d'anàlisi sensorials o instrumentals. L'anàlisi instrumental és preferible, ja que es porta a terme sota unes condicions més estrictament definides i controlades que en el cas de l'avaluació sensorial, i perquè és un mètode objectiu. L'anàlisi del perfil de textura (TPA) és un test imitatiu en el qual una peça del producte alimentari es sotmet a compressió 2 vegades successives, de manera que s'intenta imitar o reproduir l'acció mecànica de la mandíbula humana quan es mastega un aliment. D'aquest test s'obté una corba, anomenada perfil de textura, que representa la força en funció del temps, de la qual es poden extreure una sèrie de paràmetres texturals objectius que estan directament relacionats amb l'avaluació sensorial del producte (Bourne, 1982).

L'anàlisi de perfil de textura es va dur a terme mitjançant un texturòmetre TA-XT2 (Stable Microsystems Ltd., Surrey, Anglaterra) utilitzant una sonda cilíndrica d'alumini de 50 mm de diàmetre. Els assajos es van fer per triplicat sobre 3 porcions cilíndriques de cada pasta de FC, de 25 mm de diàmetre i 15 mm d'alçada, cadascuna de les quals, es va sotmetre a 2 compressions successives fins al 30 % de la seva alçada inicial (compressió del 70 %). Els diferents paràmetres del TPA es van obtenir utilitzant les següents condicions d'assaig: velocitat de 1 mm/segon; distància del 30 % i temps de 3 segons.

A partir dels gràfics del TPA es van calcular els paràmetres Duresa (en N); Adhesivitat (en N*s) i la capacitat de recuperació dels cilindres de pasta després de la primera compressió o elasticitat (*Springiness*, adimensional). A la Figura 4.3 es mostra la corba típica obtinguda en un anàlisi de perfil de textura instrumental.

- Duresa: és la força màxima de la primera compressió o mossegada del producte i es mesura com l'alçada del pic de força en el primer cicle de compressió.
- Adhesivitat: és l'àrea de la força negativa després de la primera compressió i representa el treball necessari perquè la sonda es desenganxi o es separi de la mostra.

- Elasticitat: fa referència a la capacitat de recuperació física del producte després d'haver estat deformat durant la primera compressió, o l'alçada que la mostra recupera entre el final de la primera compressió i el començament de la segona, i generalment es mesura com la distància de l'alçada del producte detectada a la segona compressió dividida per la distància de la compressió original.

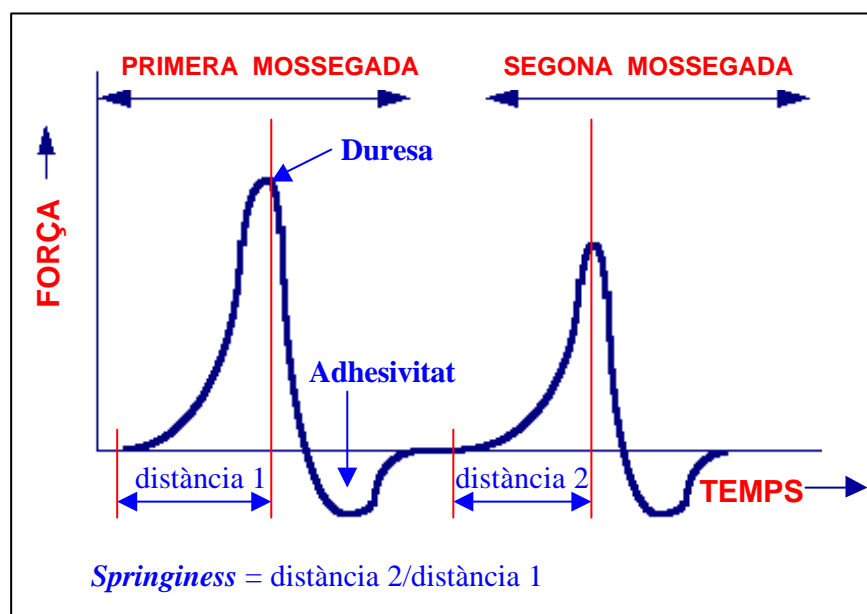


Figura 4.3: Corba estàndard d'un assaig de TPA on es mostren els diferents paràmetres calculats (http://texturetechnologies.com/texture_profile_analysis.html).

4.3.8 Anàlisi estadística de les dades

Les dades es van analitzar utilitzant el paquet estadístic JMP versió 2.0 (SAS Institute, Inc., 1990). Per avaluar els efectes dels diferents tractaments HHP a 400 MPa sobre la microbiota contaminat, solubilitat proteica, color i viscositat de la FC, es va aplicar l'anàlisi de la variància (ANOVA) a dos nivells: en primer lloc, per investigar si existien diferències significatives entre les mostres pressuritzades i les no tractades i, en segon lloc, per investigar els efectes de la temperatura (5, 20 o 40°C), la duració del tractament (5, 15 o 30 min), la mostra i les interaccions temperatura*temps, temperatura*mostra i temps*mostra entre les mostres pressuritzades.

Pel que fa als resultats de la determinació de les propietats funcionals de la FC higienitzada per HHP i deshidratada per atomització, es va aplicar l'ANOVA per investigar els efectes del tractament HHP, pH, mostra (repetició), i les interaccions tractament*pH, tractament*mostra i pH*mostra sobre la solubilitat proteica, la capacitat escumant, el percentatge d'escuma estable als 60, 90 i 120 min, els paràmetres de textura i la CRA de

les pastes de FC en pols. Quant a les propietats emulsionants, es van avaluar els efectes del tractament HHP, concentració, mostra, i les interaccions: tractament*concentració, tractament*mostra i concentració*mostra sobre l'activitat emulsionant de la FC en pols a pH 4,5 i a pH 7, així com els efectes del tractament, pH, mostra, i les interaccions tractament*pH, tractament*mostra i pH*mostra sobre l'activitat emulsionat de la FC en pols a concentracions del 0,25, 0,5 i 1 %. També es van avaluar els efectes de la pressurització i la deshidratació sobre els recomptes totals de la FC i els efectes de l'alta pressió sobre el color de la FC en pols.

Per a la comparació de mitjanes es va aplicar el test de Tukey-Kramer HDS amb un nivell de significació de $P=95$ %. Les dades que presentaven un valor de $P<0,05$ a partir del test de Barlett es van transformar. En els resultats dels recomptes microbiològics i dels temps de detecció i de generació es va utilitzar la transformació logarítmica, mentre que en els percentatges de solubilitat proteica, CRA i d'escuma estable s'aplicava la transformació $\arcsin [(\% \text{ Solubil.}/100)^{1/2}]$.

4.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

Experiments preliminars

Per fixar les condicions de pressió, temps i temperatura que es podien aplicar a la fracció cel·lular per higienitzar-la mitjançant tractament amb altes pressions hidrostàtiques es van dur a terme uns assaigs preliminars.

Un primer assaig va consistir en tractar mostres de fracció cel·lular a 400, 450 i 500 MPa de pressió, a una temperatura constant de 20°C, durant 5 i 15 minuts per determinar els efectes de l'alta pressió sobre els recomptes de microorganismes aerobis mesòfils i observar si es produïa alguna modificació de la reologia de la fracció cel·lular líquida. Tots els tractaments assajats produïen una reducció d'entre 3 i 4 unitats logarítmiques, passant de l'ordre de 10^6 ufc·mL⁻¹ a les mostres control a recomptes de 10^2 - 10^3 ufc·mL⁻¹ a les mostres pressuritzades. Tanmateix, els tractaments realitzats a 450 i 500 MPa conduïen a la formació de pastes molt espesses i, en algun cas, de pastes sòlides que impedirien qualsevol posterior tractament i utilització del producte, com per exemple la deshidratació per atomització. Per tant, es va descartar la possibilitat d'aplicació d'aquestes condicions de pressió.

Es va realitzar un segon assaig sobre 3 mostres diferents de fracció cel·lular, les quals es van sotmetre a les següents condicions de pressurització: 450 MPa, a 20°C durant 5 min, i 400 MPa, a 20 i 40°C durant 5 i 15 minuts. Es van determinar la reducció de la microbiota contaminant i la modificació de la textura del producte produïdes pels diferents

tractaments HP. Els resultats dels recomptes microbiològics es mostren a la Figura 4.4. Els tractaments realitzats a 450 MPa i a 20°C durant 5 minuts i els duts a terme a 400 MPa, a 20 i 40°C durant 15 minuts van ser els més efectius quant a la capacitat higienitzant, passant de recomptes de l'ordre de 10^6 ufc·mL⁻¹ a les mostres control a recomptes de 10^2 ufc·mL⁻¹ a les tractades. Malgrat tot, es va descartar l'aplicació de 450 MPa de pressió a la fracció cel·lular perquè produïa un gran espesseïment del producte.

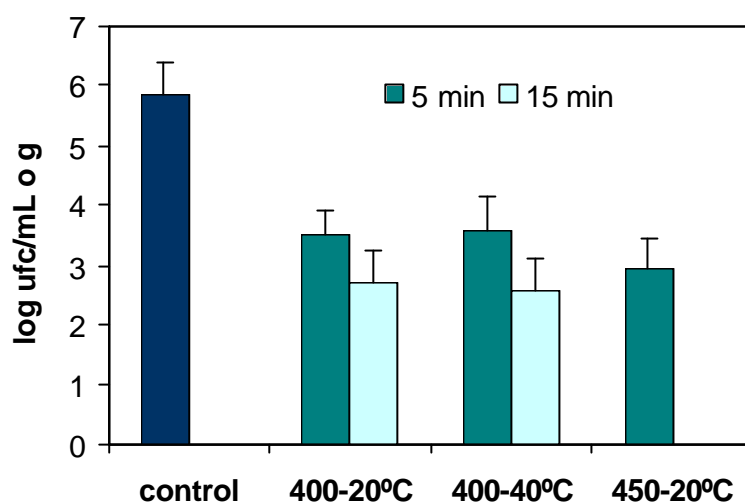


Figura 4.4: Recomptes de microorganismes mesòfils de la FC no tractada (control), de la FC sotmesa a 400 MPa, a 20 i 40°C durant 5 i 15 minuts i de la FC sotmesa a 450 MPa a 20°C durant 5 min. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

Un cop fixats 400 MPa com la pressió viable de tractament, es va realitzar un experiment amb la finalitat d'establir els límits per al període de temps de tractament durant el qual es podria pressuritzar la fracció cel·lular. Amb aquest objectiu, tres mostres de FC recollides en diferents dies però a les mateixes condicions, es van sotmetre a tractaments HHP sota condicions de pressió i temperatura constants (400 MPa i 20°C, respectivament) però modificant el temps de tractament (5, 15 i 30 minuts). Es van determinar els efectes dels 3 tipus de tractaments de pressurització sobre el recompte de microorganismes aerobis mesòfils, la capacitat de creixement dels microorganismes supervivents, la solubilitat proteica i la viscositat del producte.

A la Figura 4.5 es poden observar les corbes de creixement de la microbiota contaminant de la FC no tractada i dels microorganismes supervivents a la FC sotmesa als tractaments HHP a 400 MPa i a 20°C durant 5, 15 i 30 min. Cada corba es correspon a la mitjana de 3 repeticions per a cada mostra tractada així com de la FC control corresponent, i de cadascuna de les repeticions es van determinar 4 corbes de creixement. Les corbes de creixement dels microorganismes supervivents als tractaments HHP van mostrar que l'alta pressió produeix una inactivació considerable de la capacitat

de creixement de la microbiota contaminant, fonamentalment quan el temps de pressurització és de 15 i 30 min, si es compara amb la corba de creixement mitjana dels microorganismes presents a la FC no tractada.

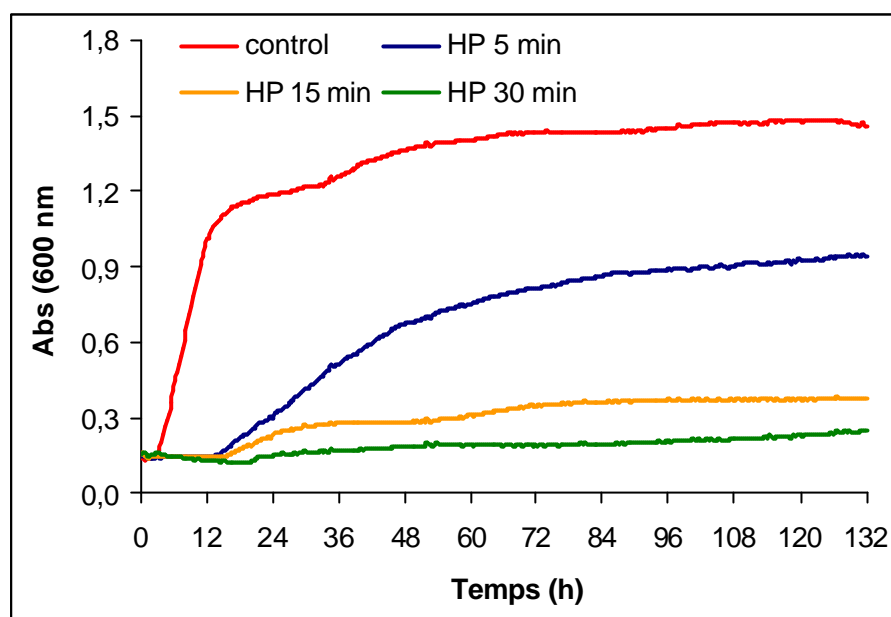


Figura 4.5: Corbes de creixement a 31°C dels microorganismes de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa i a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts. Les dades corresponen a les mitjanes de les repeticions realitzades individualment per quadruplicat sobre 3 mostres.

En aquest assaig també es va determinar el temps de detecció de les corbes de creixement dels microorganismes de la FC no tractada i de la FC sotmesa al tractament HHP (400 MPa, a 20°C) en funció del temps de pressurització. Aquest paràmetre indica la quantitat de microorganismes presents a la mostra, ja que el temps de detecció (TD), o punt de la corba on comença el creixement exponencial de la població, depèn del nombre inicial de microorganismes viables presents a la mostra i de la seva taxa de creixement (Manninen *et al.*, 1990, a; Barco *et al.*, 2000).

A la Figura 4.6, on es mostren els temps de detecció de les corbes de creixement de la microbiota contaminant de les mostres no tractades i les pressuritzades, podem observar que la pressurització produeix un augment significatiu de la fase de latència de la microbiota supervivent als tractaments HHP. El temps en el qual començava el creixement exponencial dels microorganismes presents a la FC no tractada era d'unes 5,3 hores, mentre que a les mostres tractades era significativament superior ($P < 0,05$), essent els temps de detecció del creixement microbià després del tractament HHP durant 5, 15 i 30 min, de 29,3; 89,9 i 114,3 hores, respectivament.

Tanmateix, el test de separació de mitjanes va mostrar que no existien diferències significatives entre els tractaments realitzats durant 15 i 30 min sobre el temps de detecció. Miyao *et al.* (1993, a; Tewari *et al.*, 2001) van investigar els efectes del tractament HHP sobre els microorganismes en pastes de surimi i també van trobar que la fase de latència de les corbes de creixement dels microorganismes tractats per HHP era superior a la dels no tractats.

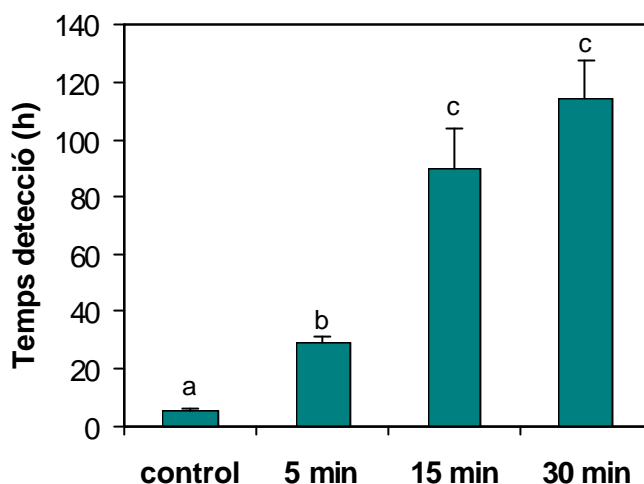


Figura 4.6: Temps de detecció (hores) del creixement de la microbiota contaminant de la FC no tractada (control) i la FC sotmesa a 400 MPa i a 20 °C durant 5, 15 i 30 minuts. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments ($P<0,05$).

En les Figures 4.7, 4.8 i 4.9 es mostren els resultats dels recomptes de microorganismes aerobis mesòfils, la solubilitat proteica i la viscositat, respectivament, de la FC sotmesa a 400 MPa, a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts, respecte dels resultats obtinguts en la FC no tractada. Els resultats van mostrar que no existien diferències significatives entre els tractaments realitzats durant 15 i 30 min sobre els recomptes microbiològics i la solubilitat proteica a pH neutre (7) i a pH àcid (4,5). Tanmateix, els tractaments realitzats durant 30 minuts produïen un increment significatiu de la viscositat del producte respecte de les mostres no tractades i les tractades durant 5 i 15 minuts.

A partir dels resultats d'aquest assaig, es va descartar la possibilitat d'aplicar els tractaments HHP de 30 minuts de duració i es va dur a terme un experiment per tal d'establir les millors condicions d'aplicació del procés d'higienització mitjançant altes pressions hidrostàtiques a la FC de la sang de porc.

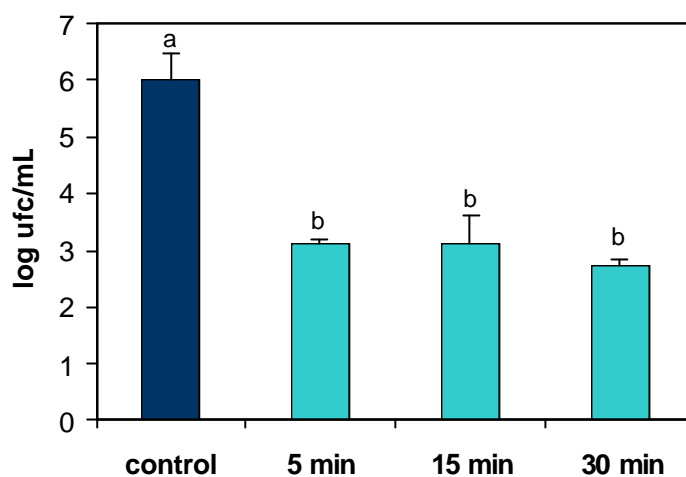


Figura 4.7: Recòmptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments ($P<0,05$).

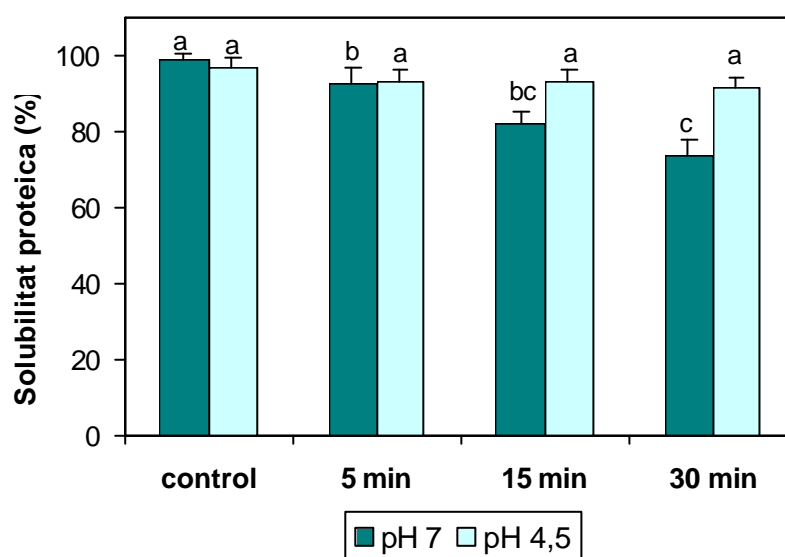


Figura 4.8: Solubilitat a pH 7 i a pH 4,5 de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa i a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments ($P<0,05$).

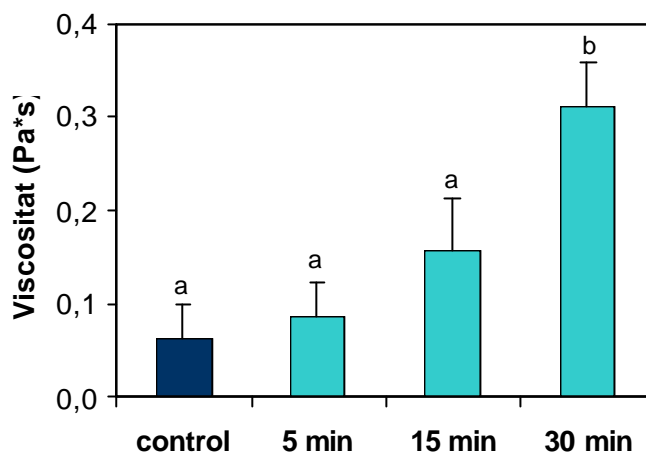


Figura 4.9: Viscositat a 25°C de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa a 20°C durant 5, 15 i 30 minuts. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments ($P<0,05$).

Es va dissenyar un experiment aleatoritzat per blocs complets sobre 5 mostres diferents de FC obtinguda en diferents dies però a les mateixes condicions (5 repeticions). Cada mostra es va dividir en 7 alíquotes, de les quals una es va utilitzar com a control i les altres 6 es van sotmetre al tractament HHP a 400 MPa de pressió i diferents combinacions de temperatura (5, 20 i 40°C) i temps (5 i 15 minuts) de pressurització. Es van investigar els efectes dels tractaments HHP sobre la microbiota contaminant i, a més a més, sobre el color, la solubilitat proteica i la viscositat de la FC (Figura 4.10).

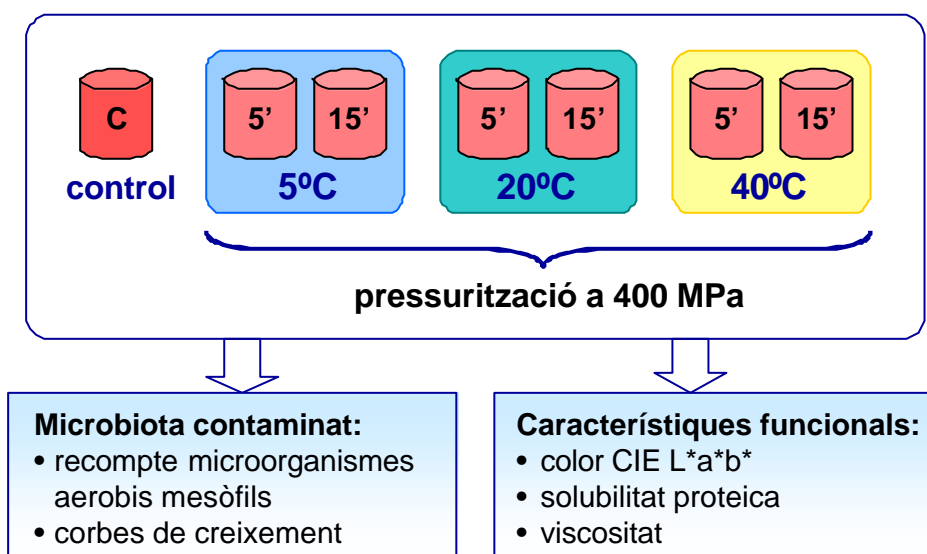


Figura 4.10: Esquema del procediment experimental dut a terme per establir les condicions òptimes de temperatura i temps per aplicar el tractament HHP a 400 MPa a la fracció cel·lular hemolitzada.

4.4.1 Efectes del tractament HHP sobre la microbiota contaminant de la fracció cel·lular

A la Figura 4.11 es mostren els recomptes de microorganismes aerobis mesòfils viables de la FC hemolitzada no tractada i l'efecte de l'alta pressió hidrostàtica sobre aquests en funció de la temperatura i el temps de tractament. L'aplicació del tractament HHP a la FC líquida produïa una disminució significativa ($P < 0,05$) de la contaminació microbiològica respecte de les mostres no tractades. L'eficàcia de reducció dels recomptes de microorganismes aerobis mesòfils depenia significativament de la temperatura i del temps de tractament ($P < 0,05$).

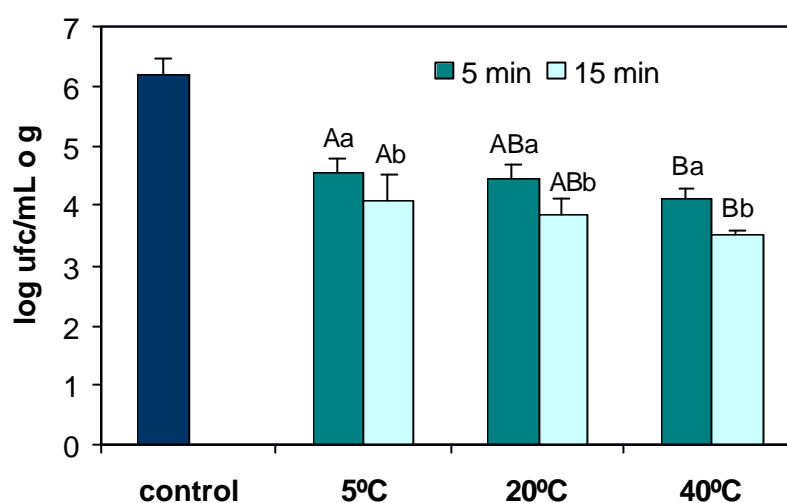


Figura 4.11: Recòmptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa en funció de la temperatura (5, 20 i 40°C) i el temps (5 i 15 minuts) de tractament. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) per a l'efecte de la temperatura (majúscules) i el temps (minúscules) entre les mostres pressuritzades.

L'aplicació del test de separació de mitjanes de Tukey-Kramer per a cadascun dels efectes principals va mostrar, per una banda, que als tractaments aplicats durant 15 minuts s'obtenien recomptes significativament inferiors que en aquells en els que la duració del tractament era de 5 minuts i, per l'altra, que els tractaments realitzats a 40°C presentaven recomptes significativament inferiors respecte als de 5°C, mentre que els realitzats a 20°C no diferien significativament de cap dels dos anteriors. Globalment, es va observar que en els tractaments aplicats durant 15 minuts a 20 i 40°C, la reducció en el recompte de microorganismes va ser d'entre 2 i 3 unitats logarítmiques. Aquesta diferència pot ser causada per l'efecte sinèrgic que produeixen les altes pressions i la temperatura sobre la reducció de la microbiota contaminat de la FC.

Parés *et al.* (2000) van observar que la capacitat de reducció dels microorganismes mitjançant la pressurització del plasma depenia directament de la temperatura i que els tractaments a 40°C produïen una major inhibició dels microorganismes que els tractaments realitzats a temperatura ambient (25°C) i en condicions de refrigeració (5°C). Hayashi (1992) també va exposar que els efectes de la pressió sobre els microorganismes era superior a 45°C que a 25°C.

Alguns autors han descrit que la pressurització a baixes i a altes temperatures és un procés més eficient per inactivar els microorganismes que quan es realitza a temperatura ambient (Cheftel *et al.*, 2000 i Gervilla *et al.*, 2000; a: Kolakowski *et al.*, 2001), però en aquest estudi hem observat que a 5°C hi ha una menor capacitat d'higienització que a temperatures superiors als 20°C.

McDonald (1992) va fer una revisió dels efectes dels tractaments HHP sobre membranes cel·lulars naturals i artificials, on exposava que la pressió incrementa l'ordenació de la doble capa lipídica i converteix l'estat fluid en un estat tipus gel ordenat, produint canvis de fase en l'estructura de la bicapa. També va indicar que les membranes menys fluides són més susceptibles als efectes de l'alta pressió i que un increment de la flexibilitat de la membrana fa augmentar la resistència dels microorganismes a la pressió. Alguns microorganismes presenten mecanismes de resposta als canvis de pH, activitat de l'aigua (a_w) o de temperatura del medi extern que afecten l'estructura i la funció de la membrana cel·lular. La principal resposta de la composició de la membrana a un canvi de temperatura per tal de mantenir les seves funcions és una alteració en els àcids grassos dels lípids. Quan la temperatura de creixement dels microorganismes disminueix de 30°C a 7°C, el principal canvi és un increment dels àcids grassos 15:0 a expenses dels 17:0. Aquest escurçament de la cadena dels lípids produeix una disminució de la seva temperatura de fusió i ajuda a mantenir la fluïdesa de la membrana a baixes temperatures. També hi ha un petit increment en la quantitat dels 18:1, i aquest augment del nivell d'insaturació contribueix a fluiditzar la membrana a una temperatura baixa i, per tant, que sigui menys sensible als efectes letals produïts per les altes pressions (Russell *et al.*, 1995). Per tant, la menor capacitat d'inhibició de la microbiota contaminant de la FC per part del tractament per altes pressions a 5°C pot ser causada perquè la refrigeració té un efecte protector de la membrana cel·lular.

Per altra banda, es va observar que la capacitat de creixement dels microorganismes supervivents als diferents tractaments HHP era inferior a la de la població bacteriana present en les mostres no tractades. A la Figura 4.12 es mostren les corbes de creixement dels microorganismes de la FC hemolitzada no tractada i l'efecte sobre aquestes dels diferents tractaments HHP aplicats. De cadascuna de les corbes es van determinar els paràmetres de creixement de la població bacteriana supervivent, els valors dels quals es mostren a la Taula 4.2.

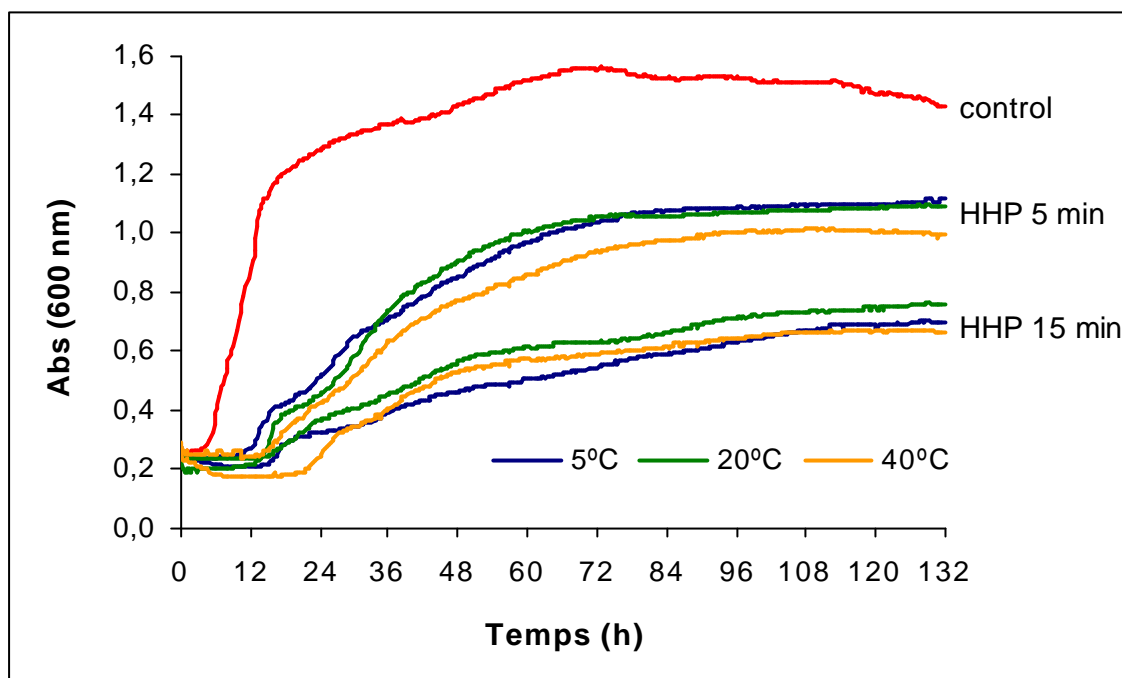


Figura 4.12: Corbes de creixement a 31°C dels microorganismes de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa, a 5, 20 i 40°C durant 5 i 15 minuts. Les dades corresponen a les mitjanes de les corbes obtingudes per quadruplicat sobre 5 repeticions.

Taula 4.2: Velocitat de creixement i temps de generació de la microbiota contaminant de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la població bacteriana supervivent en la FC sotmesa a 400 MPa en funció de la temperatura (5, 20 i 40°C) i el temps (5 i 15 minuts) de tractament ⁽¹⁾. Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) per a l'efecte de la temperatura (majúscules) i el temps (minúscules) entre les mostres pressuritzades.

Tractament	Velocitat de creixement (h^{-1})	Temps de generació (h)
Control	$0,125 \pm 0,02$	$5,74 \pm 0,84$
HP 5°C	5 min $0,048 \pm 0,02$ ^{Aa}	$16,28 \pm 4,16$ ^{Aa}
	15 min $0,029 \pm 0,00$ ^{Ab}	$24,15 \pm 2,96$ ^{Ab}
HP 20°C	5 min $0,052 \pm 0,02$ ^{Aa}	$15,39 \pm 4,09$ ^{Aa}
	15 min $0,031 \pm 0,01$ ^{Ab}	$29,48 \pm 12,4$ ^{Ab}
HP 40°C	5 min $0,038 \pm 0,01$ ^{Aa}	$20,72 \pm 6,86$ ^{Aa}
	15 min $0,026 \pm 0,00$ ^{Ab}	$26,95 \pm 0,30$ ^{Ab}

⁽¹⁾ Mitjanes de les determinacions realitzades per quadruplicat sobre cada mostra (mitjana \pm IC, n=5) ($P=95\%$).

Tant la velocitat de creixement com el temps de generació de la microbiota contaminant de les mostres control i les pressuritzades eren significativament diferents ($P < 0,05$). Els microorganismes de les mostres sotmeses a alta pressió presentaven temps de generació compresos entre 15 i 30 hores, mentre que els de la FC no tractada eren d'unes 5,7 hores. Aquests resultats posen de manifest que l'alta pressió produeix un increment de la vida útil i una millora de la qualitat higiènica de la FC de la sang de porc. Es va observar que la duració del tractament tenia efectes significatius ($P < 0,05$) tant sobre la velocitat de creixement com del temps de generació dels microorganismes supervivents. A les mostres tractades durant 15 minuts la velocitat de creixement dels microorganismes supervivents fou significativament inferior al de les mostres pressuritzades durant 5 min, mentre que el temps de generació era significativament superior. Tanmateix, a diferència dels resultats observats en els recomptes totals de microorganismes aerobis mesòfils, no es va detectar una influència significativa de la temperatura sobre la capacitat de creixement dels microorganismes contaminants.

A partir dels resultats obtinguts en referència a la capacitat de creixement de la microbiota contaminant, els tractaments més efectius amb l'objectiu de millorar la qualitat microbiològica de la FC foren els de 15 minuts de duració. Pel que fa als resultats obtinguts dels recomptes de microorganismes aerobis mesòfils, aquests van mostrar que els tractaments amb una capacitat higienitzant més efectiva, mitjançant els quals s'aconseguia una reducció d'entre 2 i 3 unitats logarítmiques, eren els realitzats a 20°C i a 40°C durant 15 minuts.

4.4.2 Efectes del tractament HHP sobre els paràmetres CIE L*a*b* del color de la fracció cel·lular

A la Taula 4.3 es mostren els valors dels paràmetres CIE L*a*b* del color de la FC no tractada i de la FC pressuritzada. Tots els tractaments HHP assajats produïen un increment significatiu dels paràmetres del color de la FC respecte de les mostres control ($P < 0,05$) per a qualsevol de les combinacions de temps i temperatura de tractament aplicades. En tots els casos, el color de la FC després de la pressurització va esdevenir més clar i amb unes tonalitats més vermella i groga. Es va observar que la temperatura de tractament afectava significativament ($P < 0,05$) la lluminositat (L^*) de la FC, essent aquesta significativament superior a les mostres tractades a 40°C que a les que havien estat tractades a temperatures inferiors (5 i 20°C). Per altra banda, només el temps de tractament tenia un efecte significatiu sobre l'increment de les coordenades a^* i b^* . La tonalitat vermella (a^*) era superior en les mostres pressuritzades durant 15 minuts a totes les temperatures de tractament. Les mostres control presentaven una tonalitat blava ($-b^*$), mentre que la FC sotmesa als diferents tractaments HHP presentava valors de la coordenada b^* positius (tonalitat groga).

Taula 4.3: Paràmetres CIE L*a*b* del color de la FC hemolitzada no tractada (control) i de les mostres de FC sotmeses a 400 MPa en funció de la temperatura (5, 20 i 40°C) i el temps (5 i 15 minuts) de tractament ⁽¹⁾. Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) per a l'efecte de la temperatura (majúscules) i el temps (minúscules) entre les mostres pressuritzades.

Tractament	L* (Lluminositat)	a* (vermell-verd)	b* (blau-groc)
Control	12,21 ± 0,48	9,75 ± 0,64	-0,80 ± 0,29
HP 5°C	5 min	13,91 ± 1,28 ^{Aa}	11,29 ± 1,95 ^{Aa}
	15 min	13,50 ± 0,14 ^{Aa}	14,58 ± 0,73 ^{Ab}
HP 20°C	5 min	13,76 ± 0,21 ^{Aa}	12,49 ± 0,74 ^{Aa}
	15 min	13,56 ± 0,35 ^{Aa}	13,82 ± 0,70 ^{Ab}
HP 40°C	5 min	14,12 ± 0,38 ^{Ba}	13,30 ± 0,86 ^{Aa}
	15 min	14,47 ± 0,88 ^{Ba}	13,76 ± 1,33 ^{Ab}

⁽¹⁾ Mitjanes de les determinacions realitzades per triplicat sobre cada mostra (mitjana ± IC, n=8) ($P=95\%$).

A qualsevol temperatura assajada, el temps de tractament tenia un efecte significatiu sobre el valor de b*. Els tractaments de 15 minuts produïen un major increment de la tonalitat groga de la FC respecte del control que els tractaments de 5 minuts. Tanmateix, l'aplicació del test de separació de mitjanes, considerant per separat cadascuna de les combinacions de temps i temperatura de tractament, va mostrar que només les mostres tractades a 40°C durant 15 minuts eren significativament menys grogues que les pressuritzades a 5°C durant 5 minuts.

El color dels aliments es pot veure afectat per la pressió i, malgrat que alguns pigments com els carotenoids, la clorofil·la i els antocians sembla que resisteixen la pressurització, els pigments carnis com la mioglobina i l'Hb, per la seva naturalesa proteica, són més sensibles. Està descrit que la carn fresca o la carn picada pateixen una pèrdua del color vermell brillant quan són tractades a pressions superiors a 300 MPa i que la pressió es pot utilitzar per descolorir l'hemoglobina (Cheftel, 1992). A diferència d'això, als nostres experiments hem observat que la FC sotmesa a 400 MPa no es descolora, sinó que visulament és més clara i d'un color vermell més intens que la no tractada, la qual cosa també s'ha posat de manifest de forma objectiva amb l'anàlisi dels paràmetres CIE L*a*b* del color.

Carlez *et al.* (1995) van estudiar els canvis produïts pel processament HHP (a 10°C durant 10 min) sobre el color i el contingut en mioglobina de mostres de carn de vedella picada envasades al buit, amb aire o oxigen. Van observar un increment de la lluminositat (color rosa) en la carn tractada entre 200 i 350 MPa que van atribuir a la desnaturalització

de la globina i/o al desplaçament o alliberament del grup hemo. Malgrat això, a diferència dels nostres resultats, aquests autors van descriure una disminució de L^* (color gris marró) i una reducció de a^* (pèrdua del color vermell), especialment entre 400 i 500 MPa, causada per l'oxidació parcial de la Mb (Fe^{2+}) cap a metaMb (Fe^{3+}), mentre que la coordenada b^* roman constant. En canvi, Goutefongea *et al.* (1995, a: Cheftel i Culioli, 1997) també van trobar que la pressurització de carn picada de porc incrementava el paràmetre a^* del color i ho van atribuir a fenòmens de coagulació de les proteïnes sarcoplasmàtiques i/o miofibril·lars induïts per la pressió.

Carlez *et al.* (1995) també van avaluar els efectes del tractament HHP en combinació amb l'addició d'àcid ascòrbic, cisteïna, nicotinamida, àcid nicotínic, nitrit sòdic, clorur sòdic i un segrestador d'oxigen en carn envasada al buit per prevenir l'oxidació i poder reduir l'alteració del color de la carn. Només el nitrit sòdic, el clorur sòdic i el segrestant d'oxigen van proporcionar certa protecció enfront l'oxidació. Aquests autors exposen que s'hauria de considerar la interacció entre les mostres de carn pressuritzades i els compostos químics del material d'envasament, donat que alguns tipus de materials d'envasament són capaços de segrestar o absorbir l'oxigen i, per tant, poden prevenir el canvi del color característic de la carn.

Bruun-Jensen i Skibsted (1996) van estudiar els efectes de l'alta pressió sobre l'oxidació de la nitrosilMb (pigment dels productes carnis curats). Aquests van pressuritzar sistemes model carnis curats fins a 300 MPa i van observar una disminució de la taxa d'oxidació de la nitrosilMb per l'oxigen en augmentar la pressió. A 300 MPa, a 15°C i en una solució saturada d'aire, a pH 6,8, la taxa d'oxidació de la nitrosilMb era menor que en condicions de pressió i temperatura ambientals. Els autors expliquen que l'efecte protector de l'alta pressió no era conseqüència de fenòmens de desnaturalització proteica, ja que la presència d'urea com agent desnaturalitzant, a pressió atmosfèrica, tenia l'efecte oposat a un augment de pressió, incrementava la taxa d'oxidació. En aquest sentit, els tractaments HHP podrien protegir aquest pigment de l'oxidació als productes curats.

Cheah i Ledward (1996) van investigar els efectes de l'alta pressió sobre l'oxidació dels lípids en carn picada de porc, sotmetent algunes mostres a 800 MPa i a 20°C durant 20 min i d'altres a cocció a 80°C durant 15 min. Les mostres eren emmagatzemades durant 8 dies a 4°C. Van observar que les mostres pressuritzades mostraven una oxidació més ràpida que les no tractades i una conversió de la forma reduïda Mb/oxiMb a la forma fèrrica desnaturalitzada a pressions superiors a 400 MPa. Malgrat que els mecanismes de la desnaturalització tèrmica i per pressió de les proteïnes de la carn són similars, l'estabilitat de les proteïnes a la pressió i a la calor és diferent. La desnaturalització proteica no incrementa gradualment amb la intensitat de pressió com en el cas de la desnaturalització tèrmica. En un treball posterior, Cheah i Ledward (1997) van estudiar la inhibició de la formació de metaMb en la carn fresca de vedella mitjançant l'aplicació de

pressió (80-100 MPa durant 20 min) i observaren que l'aplicació de pressions moderades millorava l'estabilitat del color de la carn.

Com ja s'ha descrit als capítols 2 i 3, la desnaturalització tèrmica de l'Hb afavoreix l'oxidació del ferro hèmic de l'Hb i aquesta passa a metaHb, de color marró fosc. El mateix procés oxidatiu és el responsable de l'enfosquiment observat quan la FC es deshidrata per atomització. El fet que el tractament HHP produeixi un increment dels paràmetres L^* i a^* del color suggereix que els efectes de la pressió sobre l'Hb són diferents als dels tractaments tèrmics i que l'alta pressió produeix algun canvi en la conformació de la molècula, que es tradueix en un canvi en el color, el mecanisme del qual hauria de ser diferent al de l'oxidació del grup hemo.

4.4.3 Efectes del tractament HHP sobre la solubilitat proteica de la fracció cel·lular

A la Figura 4.13 es mostra la solubilitat proteica a pH 7 i a pH 4,5 de les mostres de FC control i de la FC sotmesa als tractaments HHP, en funció de la temperatura i el temps de pressurització. El tractament HHP produïa una disminució de la solubilitat a pH 7 de la proteïna de la FC, la qual era dependent de la temperatura i del temps de processat ($P < 0,05$). Les mostres pressuritzades a 5°C eren significativament menys solubles a pH 7 que les tractades a 20°C, mentre que les tractades a 40°C no diferien significativament de les dues anteriors. Els tractaments realitzats durant 15 minuts tenien un major efecte sobre la solubilitat a pH neutre que els de 5 minuts, fonamentalment quan es duïen a terme a 5°C i a 40°C, mentre que a temperatura ambient es produïa un menor efecte sobre la solubilitat a pH 7 de l'Hb.

La desnaturalització proteica produïda per l'alta pressió pot ser diferent a la desnaturalització causada per les altes temperatures, perquè els ponts d'hidrogen i les interaccions hidrofòbiques i electrostàtiques, les quals estableixen les subunitats de l'Hb, es comporten d'una manera diferent quan són sotmeses a pressió que quan es sotmeten a tractaments tèrmics (Morild, 1981; a: Defaye *et al.*, 1995). La desnaturalització proteica per la pressió és causada com una resposta a una disminució de volum que es produeix a la solució proteica, mentre que la desnaturalització causada per la calor és resultat del moviment violent de les molècules que condueix a la destrucció dels enllaços covalents (Okamoto *et al.*, 1990).

La desnaturalització proteica per la pressió és un fenomen complex que depèn de l'estructura de la proteïna, interval de pressió, temperatura, pH i composició del solvent. Les proteïnes oligomèriques són dissociades per pressions relativament baixes (200 MPa), mentre que la desnaturalització d'una cadena proteica senzilla es produeix a pressions superiors a 300 MPa (Masson, 1992, a: Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). Les

altes pressions poden causar des de la dissociació de subunitats proteiques, probablement a causa del debilitament d'interaccions hidrofòbiques, fins al desplegament o la desnaturalització parcial d'estructures monomèriques, causades pel debilitament d'interaccions hidrofòbiques i per la ruptura de ponts salins intramoleculars, donat que l'estructura proteica nativa no és compacta, ni rígida, ni estàtica (Cheftel, 1992) i tots aquests fenòmens induïxen canvis conformacionals i estructurals en les proteïnes.

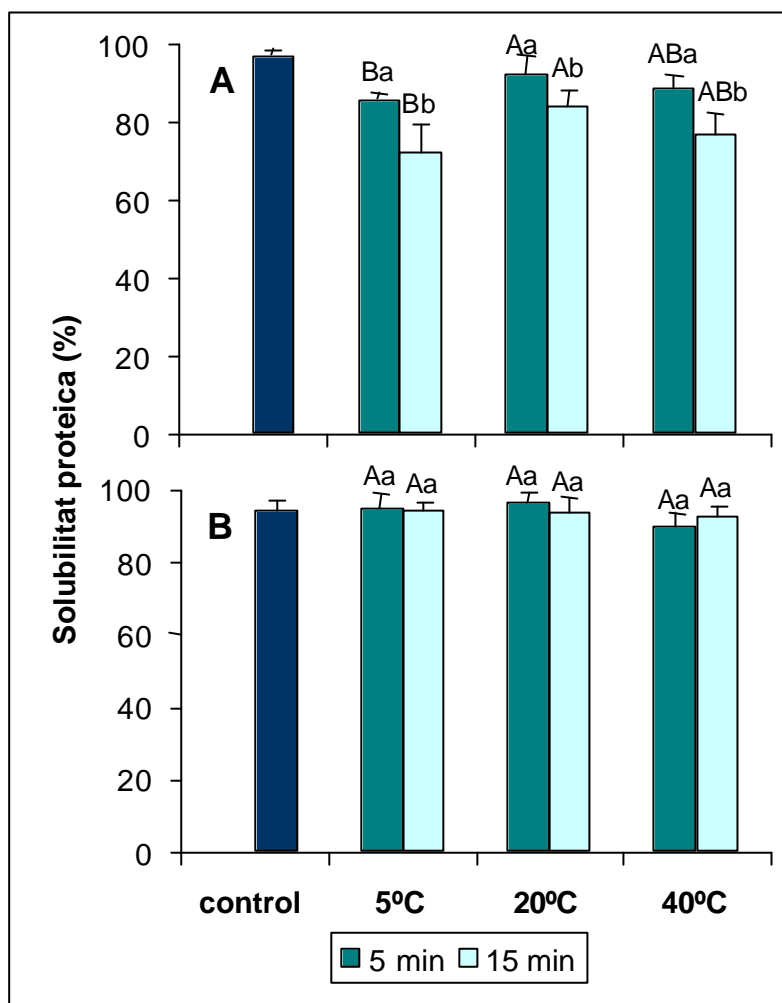


Figura 4.13: Solubilitat proteica a pH 7 (A) i a pH 4,5 (B) de la FC hemolitzada no tractada (control) i de les mostres de FC sotmeses a 400 MPa a tres temperatures (5, 20 i 40°C) durant 5 i 15 minuts. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte de la temperatura (majúscules) i el temps (minúscules) entre les mostres pressuritzades.

Està descrit que l'alta pressió pot induir desnaturalització proteica a diferents temperatures de tractament i que es poden produir diferents mecanismes de desnaturalització mitjançant combinacions específiques de pressió i temperatura (Suzuki, 1960; Van Camp, 1996). Els contorns el·líptics dels diagrames de fase

pressió/temperatura per a la desnaturalització de les proteïnes (Figura 4.14) indiquen les condicions de temperatura-pressió sota les quals les proteïnes mantenen o perden la seva estructura nativa. La desnaturalització proteica pot ésser induïda per l'alta pressió a baixes o altes temperatures (Gross i Jaenicke, 1994), de manera que als tractaments realitzats a temperatures moderades es requereixen pressions més elevades per induir la desnaturalització (zona II) que als que es duen a terme a temperatures inferiors o superiors (zones I i III). El grau de desnaturalització proteica produït per l'alta pressió pot incrementar quan es combina amb una temperatura baixa o alta (a causa de l'efecte sinèrgic de la temperatura i la pressió) o pot disminuir per l'efecte competitiu resultant de la interacció entre la pressió i l'alta o baixa temperatura (Hayashi, 1992).

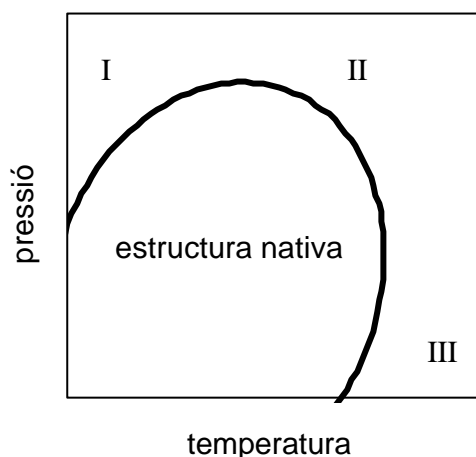


Figura 4.14: Representació esquemàtica del diagrama de fase pressió/temperatura per a la desnaturalització de les proteïnes.

Per altra banda, els tractaments HHP pràcticament no afectaven la solubilitat a pH 4,5 de la FC respecte de les mostres control. Aquests resultats suggereixen que el tractament HHP té un cert efecte desnaturalitzant sobre l'Hb que es tradueix en una clara disminució de la solubilitat proteica a pH 7, condicions de pH properes al punt isoelèctric (PIE) de l'Hb, que segons Stryer (1995) és 6,9 en l'oxihemoglobina i 6,7 en la desoxihemoglobina.

Defaye *et al.* (1995) van descriure que la pressurització de solucions de metamioglobina a 750 MPa, a temperatura ambient durant 20 minuts prop del PIE (pH 6,9) produïa una reducció de la solubilitat i la formació de precipitats, i van suggerir que tant els ponts d'hidrogen com les interaccions electrostàtiques contribuïen a la formació del precipitat. A pH àcid, la presència de càrregues elèctriques a l'Hb parcialment desplegada, podria evitar l'agregació de les molècules i permetre el manteniment de la seva solubilitat. En canvi, l'absència de forces elèctriques repulsives prop del PIE afavoreix la precipitació i la pèrdua de solubilitat.

Van Camp *et al.* (1996) van observar la precipitació de l'Hb quan aplicaven altes pressions (300-400 MPa) a 50°C i van suggerir que la combinació de les altes pressions i les altes temperatures induïa efectes sinèrgics complexos en l'Hb, produint com a resultat un excessiu desplegament de l'estructura globular de la molècula. Això feia que un gran nombre de residus aminoàcids apolars, l'Hb és rica en residus apolars, quedessin exposats a un ambient aquós, de manera que la molècula es tornava menys soluble i es formava un precipitat enlloc d'un coàgul o un gel. Aquests autors també van exposar que l'increment de la temperatura de processament afavoria la formació d'interaccions hidrofòbiques proteïna-proteïna al precipitat proteic enlloc de proteïna-aigua.

Timson i Short (1965, a: Tewari *et al.*, 2001) suggerien que un possible mecanisme per a la desnaturalització proteica causada per la pressurització és la ionització i subseqüent precipitació dels complexos proteics. L'aplicació de l'alta pressió incrementa la solvatació d'ions i la ionització d'electròlits dèbils; les molècules dèbilment carregades, que són comprimides conjuntament cap als grups iònics carregats, fan incrementar la càrrega total. Aquest fenomen proporciona suficient energia perquè els grups oposadament carregats es combinin entren ells, cosa que pot no ocórrer sota condicions normals. D'aquesta manera, es formen ponts iònics que fan disminuir la solubilitat de la molècula proteica a causa d'una disminució en el nombre de grups hidrofílics lliures i, com a conseqüència, les proteïnes de la solució precipiten.

4.4.4 Efectes del tractament HHP sobre la reologia de la fracció cel·lular

La reologia descriu les propietats físiques dels aliments i fa referència a l'estudi del flux i la deformació dels materials. Les propietats reològiques poden servir per controlar o monitoritzar un procés, de manera que, per exemple, la viscositat aparent d'un producte alimentari disminueix durant la hidròlisi enzimàtica, mentre que augmenta durant la desnaturalització proteica (Sharma *et al.*, 2000). La viscositat és una mesura de la resistència d'un fluid a fluir, és a dir, de la fricció interna que actua a l'interior d'un fluid. La viscositat és una propietat hidrodinàmica que descriu la magnitud de la resistència a un esforç tallant en el sí d'un líquid. És també una mesura de la velocitat de flux (Lewis, 1990).

La viscositat de la sang té unes característiques complexes perquè consisteix en una fase líquida en la qual està suspesa una fracció cel·lular concentrada. Segons Rampling (1990) una suspensió de fracció cel·lular és un fluid newtonià. Als fluids newtonians (com la llet, suc de taronja, vi, oli), la relació entre la força de tall o cisalla (*shear stress*) i el gradient de deformació o cisalla (*shear rate*) és lineal, i la constant de proporcionalitat és la viscositat aparent, mentre que als fluids no-newtonians (mel, nata, xarops de sucre, salses de tomàquet) aquesta relació no és lineal (Sharma *et al.*, 2000).

La viscositat de la FC no tractada i de la FC sotmesa als diferents tractaments HHP en funció de les condicions de temperatura i temps d'aplicació assajades es mostra a la Figura 4.15. Es va observar que l'aplicació del tractament HHP incrementava la viscositat de la FC líquida.

La temperatura i, principalment, el temps de pressurització tenien un efecte significatiu sobre l'augment de la viscositat i, a més, ambdós factors interaccionaven de manera significativa. És important tenir en consideració que el factor temps explica el 67 % de la variabilitat de les dades i, en canvi, la temperatura només en justifica un 10 %. Els tractaments realitzats durant 15 minuts incrementaven la viscositat de la FC i aquest efecte era significativament superior a baixes (5°C) i altes (40°C) temperatures que a temperatura ambient (20°C).

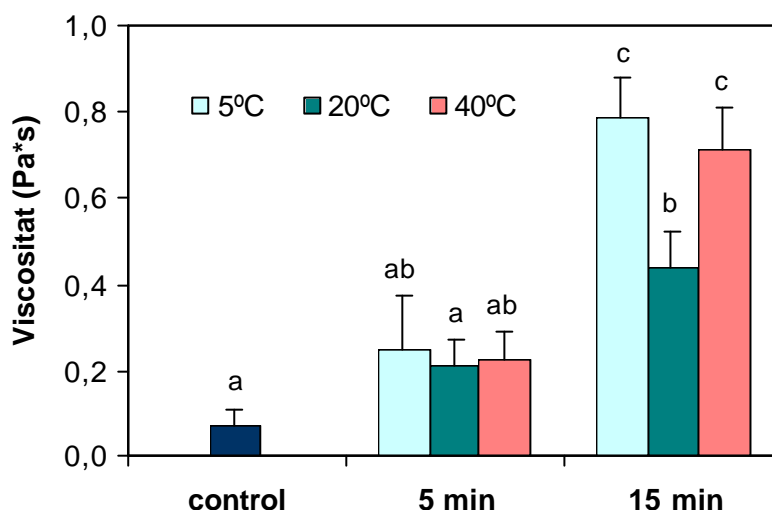


Figura 4.15: Viscositat a 25°C de la FC hemolitzada no tractada (control) i de la FC sotmesa a 400 MPa a tres temperatures (5, 20 i 40°C) durant 5 i 15 minuts. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Els tractaments amb lletres diferents són diferents significativament ($P<0,05$).

Els canvis en la reologia de la FC com a conseqüència de l'aplicació de l'alta pressió estan estretament relacionats amb els efectes observats en la solubilitat proteica a pH 7, donat que els tractaments que produeixen el major increment de la viscositat són aquells que produeixen una major desnaturalització de l'Hb, la qual es tradueix en una reducció de la seva solubilitat a pH 7. Aquest increment de la viscositat es podria explicar a partir del fet que l'alta pressió produeix un augment de la hidrofobicitat superficial i induïx processos d'agregació entre molècules d'hemoglobina parcialment desplegades, els quals provoquen un augment de la fricció interna (Van Camp, 1996); a més, també cal tenir en compte que aquests processos d'agregació proteica es poden veure afavorits per l'elevada concentració de proteïna que presenta la FC (35 %).

A partir dels resultats obtinguts sobre els efectes del tractament HHP a 400 MPa, a 5, 20 i 40°C, durant 5 i 15 min, sobre la qualitat microbiològica, el color, la solubilitat proteica i la viscositat de la FC de la sang de porc, es va escollir el tractament a 400 MPa a 20°C durant 15 minuts com a procés d'higienització de la FC previ a la conservació mitjançant la deshidratació per atomització. Aquestes condicions del tractament per HHP permeten una reducció significativa de la microbiota contaminant de la FC i alhora no produeixen gaires modificacions de la viscositat i la solubilitat proteica, ni tenen efectes negatius sobre el color del producte.

4.4.5 Propietats funcionals de la fracció cel·lular higienitzada per altes pressions hidrostàtiques i deshidratada per atomització

Al Capítol 1 ja s'ha exposat que les propietats funcionals més importants de l'Hb de la FC són la solubilitat, l'activitat emulsionant, la capacitat de desenvolupar escumes estables i la capacitat d'inflament amb aigua i de formar pastes per escalfament, les quals presenten una elevada capacitat de retenció d'aigua (Nakamura *et al.*, 1984; Tybor *et al.*, 1975; Wismer-Pedersen, 1988). L'alta pressió afecta significativament a les estructures secundària, terciària i quaternària de les proteïnes i, com que la funcionalitat proteica depèn en gran mesura de l'estructura terciària, amb els tractaments HHP es poden obtenir propietats funcionals noves (Tewari *et al.*, 2001).

En aquest apartat s'exposen els resultats obtinguts en la determinació de la funcionalitat de la FC higienitzada pel tractament HHP a 400 MPa i a 20°C durant 15 min i deshidratada per atomització a 140°C, així com els efectes dels dos processos tecnològics sobre la qualitat microbiològica de la FC i els de l'alta pressió sobre el color de la FC en pols.

Els resultats de les determinacions dels recomptes microbiològics de la FC control i la FC higienitzada per HHP abans i després de la deshidratació per atomització, es presenten a la Figura 4.16. L'ANOVA va mostrar que existien diferències significatives ($P < 0,05$) sobre la microbiota contaminant de la FC per l'efecte del tractament (HHP i deshidratació). El test de separació de mitjanes va diferenciar 3 grups: (1) la FC no tractada líquida, (2) la FC no tractada en pols, i (3) les mostres de FC pressuritzada líquida i en pols. L'aplicació de l'alta pressió produeix una disminució dels recomptes totals de la FC de l'ordre de 3,2 unitats logarítmiques, tal com s'ha discutit en la primera part d'aquest capítol (apartat 4.4.1). Per altra banda, la deshidratació per atomització produeix una disminució de l'ordre d'una unitat logarítmica dels microorganismes presents a la FC no tractada, el mateix ordre de magnitud que es va trobar al capítol 2.

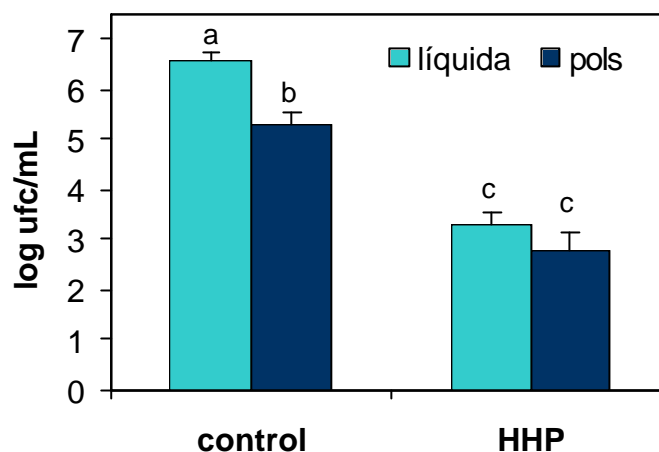


Figura 4.16: Recòmptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC no tractada (control) i de la FC tractada per HHP, abans i després de la deshidratació per atomització. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) entre tractaments.

Pel que fa a la FC pressuritzada, l'aplicació del procés de deshidratació produeix una lleugera disminució de la microbiota contaminat (0,5 unitats logarítmiques). Tanmateix, els recòmptes totals de la FC tractada per HHP abans i després de la deshidratació no són significativament diferents. Aquests resultats s'expliquen perquè la població microbiana supervivent al tractament HHP és diferent a la població original present a la FC no tractada. L'alta pressió ha produït un canvi en la composició relativa dels diversos grups de microorganismes que formaven part de la microbiota original de la FC, la qual cosa determina que els diversos grups de microorganismes presents en ambdós tipus de productes siguin diferents. Segurament, la microbiota que ha sobreviscut el tractament HHP també és menys susceptible al dany tèrmic produït per la deshidratació per atomització i, per tant, més resistent a l'efecte reductor de la contaminació general per part de la deshidratació. En qualsevol cas, la FC higienitzada per altes pressions i deshidratada per atomització presenta un recompte final de l'ordre de 2,8 unitats logarítmiques, el qual és 2,5 ordres de magnitud inferior al de la FC control en pols.

A la Taula 4.4 es mostren els paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color de la FC no tractada i la FC higienitzada per HHP deshidratades per atomització. La FC pressuritzada en pols presentava uns valors dels paràmetres L^* , a^* i b^* del color una mica més elevats que la FC control en pols, és a dir, la primera era lleugerament més clara, més vermella i més groga que la no tractada. Tanmateix, cap dels 3 paràmetres del color de les dues mostres deshidratades eren significativament diferents per l'efecte del tractament HHP.

Taula 4.4: Valors dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color de la FC no tractada (control) i la FC tractada per HHP deshidratades per atomització ⁽¹⁾. Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) entre tractaments.

Paràmetres del color	FC pressuritzada en pols	FC control en pols
L^* (Lluminositat)	$38,98 \pm 1,51^a$	$38,60 \pm 1,43^a$
a^* (To vermell-verd)	$+21,02 \pm 1,48^a$	$+20,36 \pm 1,32^a$
b^* (To groc-blau)	$+14,39 \pm 0,75^a$	$+14,22 \pm 0,60^a$

⁽¹⁾ Mitjanes de les determinacions fetes individualment com a mínim per triplicat sobre cada mostra (mitjana \pm IC, $n=5$) ($P=95\%$).

Aquests resultats mostren que l'efecte oxidatiu de la deshidratació per atomització sobre el Fe del grup hemo és dominant i, encara que l'alta pressió produeix un augment dels paràmetres L^* i a^* del color de la FC líquida, les mostres tractades per HHP són igual de susceptibles a l'enfosquiment oxidatiu produït per la deshidratació que les mostres control.

4.4.5.1 Solubilitat proteica

En la Figura 4.17 es mostra l'efecte del tractament per alta pressió hidrostàtica i del pH (4,5 i 7) sobre la solubilitat proteica de la FC en pols. La pressurització i el pH tenien efectes significatius ($P < 0,05$) sobre la solubilitat proteica de la FC en pols. La solubilitat de la FC tractada per HHP era significativament inferior a la de la FC control i, per altra banda, a pH neutre era inferior a la solubilitat a pH àcid en els 2 tipus de mostres però fonamentalment en la FC pressuritzada. Tot i així, no existia una interacció significativa entre el tractament i el pH.

La FC control en pols presentava una solubilitat a pH 4,5 del 98 %, i del 94 % a pH 7, mentre que la sotmesa a HHP i deshidratada tenia un 94 % i un 80 % de solubilitat, a pH àcid i neutre, respectivament. Aquests resultats concorden amb el comportament observat en la solubilitat de l'Hb de la FC pel que fa als efectes de l'alta pressió (apartat 4.3.3) i de la deshidratació (capítol 2), és a dir, ambdós processos produeixen una desnaturalització de l'Hb i això es tradueix en una reducció de la seva solubilitat proteica als 2 pHs assajats. Tanmateix, l'aplicació del tractament HHP produeix una disminució de la solubilitat a pH 7 (PIE de l'Hb) de la FC en pols més intensa (un 15 % de reducció) que en condicions de pH 4,5 (un 4 % de reducció). Aquest comportament també es va observar en la FC líquida: el tractament HHP (400 MPa, 20°C, 15 min) produïa una pèrdua de la solubilitat de l'Hb a pH 7 del 13 %, mentre que a pH 4,5 la reducció era del

1,3 %. Per tant, l'alta pressió augmenta la susceptibilitat de la proteïna a la desnaturalització tèrmica induïda per la deshidratació per atomització.

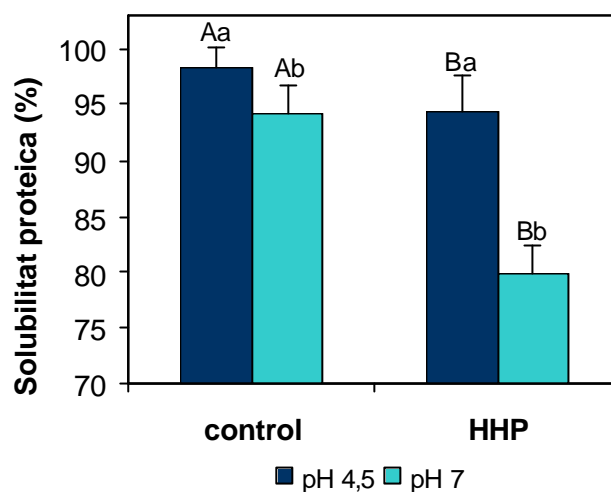


Figura 4.17: Solubilitat proteica (%) a pH 4,5 i pH 7 de la FC tractada per HHP i la FC no tractada (control) deshidratades per atomització. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del tractament (majúscules) i el pH (minúscules).

Donat que l'exposició a les altes pressions produeix el desplegament de la molècula proteica i aquest desplegament es tradueix en alteracions de les propietats funcionals de la proteïna, les capacitats escumant, emulsionant, gelificant i de retenció d'aigua de les proteïnes estan influenciades per l'alta pressió. Les proteïnes tractades per HHP permeten el desenvolupament d'un gran ventall d'ingredients alimentaris funcionals preparats a partir de proteïnes alimentàries mitjançant un desplegament controlat (Johnston *et al.*, 1992, a; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). D'aquesta manera, els efectes desnaturalitzants de l'alta pressió sobre l'Hb poden tenir efectes favorables o negatius en les diferents propietats funcionals de la FC.

4.4.5.2 Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma

Les propietats escumants i emulsionants de les proteïnes són les propietats de superfície relacionades amb la capacitat que presenten les proteïnes de disminuir la tensió interfasial entre els components hidrofòbics i hidrofílics d'un aliment. Les escumes alimentàries consisteixen en bombolles d'aire dispersades i envoltades per una fase líquida contínua que conté l'agent soluble amb activitat de superfície. El comportament de les proteïnes a les interfases influeix la formació d'emulsions i escumes, de manera que les proteïnes que presenten una bona activitat de superfície disminueixen la tensió

interfasial, facilitant la deformació de la fase líquida, i formen una pel·lícula contínua, flexible, elàstica i cohesiva al voltant de les cel·les de gas. Per aconseguir una distribució uniforme de les cel·les d'aire a través de la matriu proteica, cal que es produeixi cert grau de desnaturalització per tal que els grups polars es reorientin cap a l'aigua i els no polars cap a l'aire. Les proteïnes formen un film continu mitjançant interaccions proteïna-proteïna estabilitzades per interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques i ponts d'hidrogen (Zayas, 1997).

La capacitat d'una proteïna per formar escumes estables amb aire es pot mesurar amb paràmetres com la capacitat escumant, expansió d'escuma, o *overrun*, els quals mesuren l'increment de volum màxim d'una dispersió proteica com a conseqüència de la incorporació d'aire mitjançant batut, agitació o aireació. La capacitat escumant mesura l'increment de volum després d'haver introduït aire en una solució o dispersió proteica, mentre que l'estabilitat de l'escuma és la capacitat que presenta una escuma formada de mantenir el màxim volum en el temps i es determina com la pèrdua de líquid per part de l'escuma per la desestabilització, o bé com la disminució del volum d'escuma al cap d'un determinat període de temps de repòs.

La capacitat escumant a pH 4,5 i pH 7 de la FC control en pols i de la FC tractada per HHP i deshidratada per atomització es mostra a la Figura 4.18, mentre que a la Figura 4.19 es representen els resultats de la determinació de l'estabilitat de les escumes formades amb els 2 tipus de mostres de FC en pols durant un període de repòs de 2 hores en funció del pH.

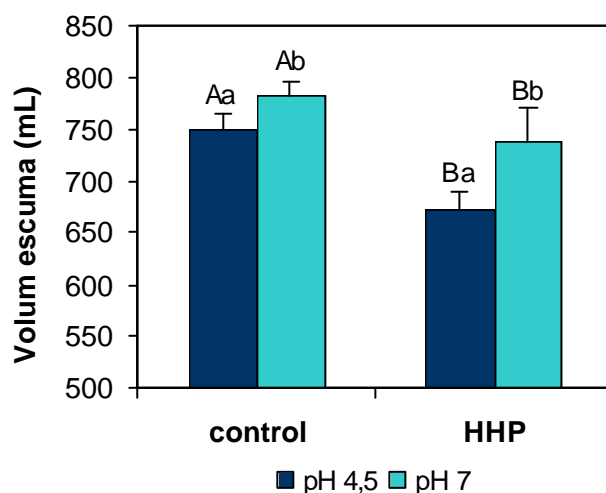


Figura 4.18: Capacitat escumant (volum d'escuma en mL) a pH 4,5 i pH 7 de la FC tractada per HHP i la FC no tractada (control) deshidratades per atomització. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del tractament (majúscules) i el pH (minúscules).

Pel que fa al volum d'escuma obtingut amb les solucions de FC en pols al 0,5 % (p/v) (Figura 4.18), es va observar que existien diferències significatives tant per a l'efecte del tractament HHP com del pH ($P < 0,05$). L'efecte desnaturalitzant de l'alta pressió sobre l'Hb produïa una disminució de la capacitat escumant de la FC en pols a pH àcid i a pH neutre. El volum d'escuma obtingut amb la FC pressuritzada en pols era un 7 i un 6 % inferior a l'obtingut amb la FC control, a pH 4,5 i a pH 7, respectivament. Quant al pH, la capacitat escumant de la FC en pols era superior a pH neutre. També es va observar un efecte significatiu ($P < 0,05$) de la mostra, que es pot atribuir a la metodologia utilitzada per determinar aquesta propietat.

El pH afecta a les propietats escumants de les proteïnes i s'ha observat que la capacitat de formació d'escuma de les proteïnes sol ser màxima a valors de pH propers als del PIE, sempre i quan la proteïna escumant mantingui la seva solubilitat en el medi aquós, donat que part de l'efecte del pH està relacionat amb la desnaturalització d'una porció de les proteïnes solubles que intervenen en la formació del film de l'escuma. Al PIE, es produeixen més interaccions electrostàtiques entre proteïnes, s'adsorbeixen més proteïnes a la interfase, es redueix la tensió interfasial i, en conseqüència, es millora l'estabilitat de l'escuma (Zayas, 1997). Sembla que per a la formació del film proteic que estabilitza l'escuma és necessari un cert grau de cohesió (interacció proteïna-proteïna) que no es produeix si la proteïna està massa solubilitzada (interacció proteïna-aigua). Per altra banda, una excessiva interacció proteïna-proteïna dóna lloc a una agregació, desnaturalització i pèrdua de la capacitat escumant, però si una proteïna manté certa solubilitat, en condicions properes al seu PIE, es faciliten les interaccions entre les proteïnes i, per tant, la formació d'una pel·lícula proteica més resistent. Per aquest motiu, la màxima capacitat escumant de la FC s'observa al PIE de l'Hb.

Quant a l'estabilitat de l'escuma formada, a la Figura 4.19 es mostra l'evolució del percentatge d'escuma durant un període de 2 hores de repòs. Es va observar, per una banda, que els volums d'escuma per a tots els tipus de mostres disminuïen molt progressivament en el temps, malgrat que a pH àcid l'estabilitat de l'escuma era menor que a pH neutre, fonamentalment a partir dels 30 min de repòs. Tot i així, a pH 7 i al cap de 2 hores de repòs, la FC deshidratada encara presentava entre un 40 i un 50 % del volum d'escuma inicial (per a les mostres control i les tractades per HHP, respectivament); per altra banda, les escumes obtingudes a pH 7 amb FC tractada per HHP eren més estables que les de FC control. Per tant, sembla que l'alta pressió produeix un increment de l'estabilitat de l'escuma que forma la FC a pH neutre.

A la Taula 4.5 es mostren els efectes del tractament HHP i del pH sobre el percentatge d'escuma que roman estable al cap de 60, 90 i 120 min de repòs. L'ANOVA va mostrar, en primer lloc, que el tractament HHP no tenia efectes significatius ($P > 0,05$) sobre el % d'escuma estable durant els 3 períodes de repòs i, en segon lloc, que l'estabilitat de l'escuma a pH 7 sempre era significativament superior ($P < 0,05$) que a pH 4,5. Per tant,

podem concloure que el tractament HHP no millora l'estabilitat escumant però tampoc disminueix aquesta propietat. Per contra, sí que disminueix la capacitat escumant de la FC deshidratada.

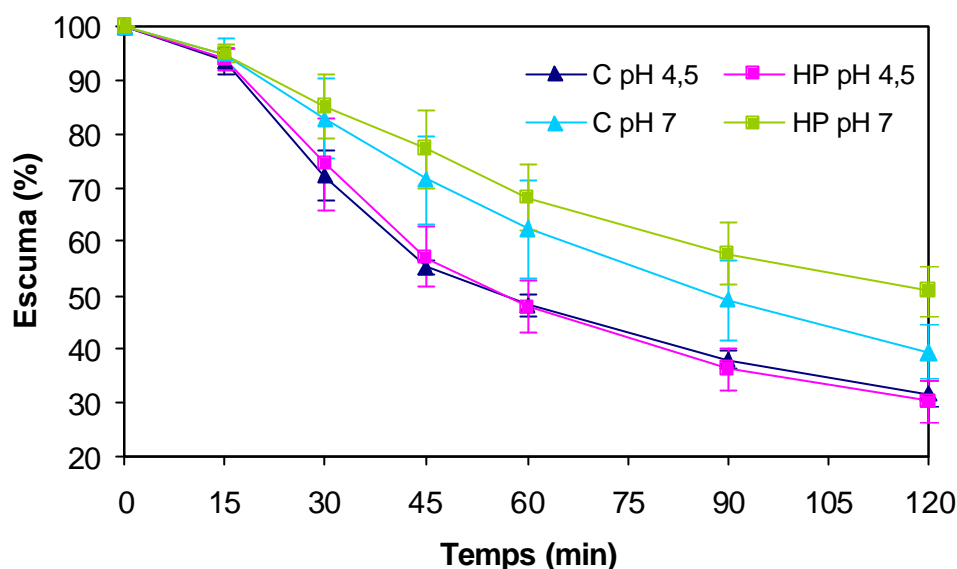


Figura 4.19: Estabilitat de l'escuma (%) a pH 4,5 i pH 7, formada amb FC tractada per HHP i FC no tractada (control) deshidratades per atomització. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

Taula 4.5: Percentatge d'escuma (%) als 60, 90 i 120 min de repòs, obtinguda a partir de FC tractada per HHP i FC no tractada (control) deshidratades per atomització, en funció del pH ⁽¹⁾. Les lletres diferents a la mateixa fila indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del tractament (majúscules) i el pH (minúscules).

Temps	FC control		FC pressuritzada	
	pH 4,5	pH 7	pH 4,5	pH 7
60 min	48,2 ± 2,0 ^{Aa}	62,2 ± 8,9 ^{Ab}	47,9 ± 4,9 ^{Aa}	68,1 ± 6,1 ^{Ab}
90 min	38,1 ± 1,6 ^{Aa}	49,0 ± 7,3 ^{Ab}	36,2 ± 3,9 ^{Aa}	57,5 ± 5,8 ^{Ab}
120 min	31,7 ± 2,4 ^{Aa}	39,4 ± 4,9 ^{Ab}	30,0 ± 3,8 ^{Aa}	50,7 ± 4,5 ^{Ab}

⁽¹⁾ Mitjanes ± IC (n=5, $P=95\%$)

A diferència dels nostres resultats, Parés (1998) va observar que el tractament HHP (450 MPa durant 15 minuts i a 40°C) aplicat a la fracció plasmàtica de la sang de porc, produïa una disminució de la solubilitat proteica, però no afectava la capacitat escumant i millorava l'estabilitat de l'escuma obtinguda. Per altra banda, De Vuono *et al.* (1979), en un treball on comparaven diferents propietats funcionals d'algunes fraccions de sang bovina liofilitzades (plasma, seroalbúmina, seroglobulina i globina), van trobar que la

globina, obtinguda a partir de l'Hb mitjançant el procés de descoloració de la FC amb àcid i acetona, presentava un solubilitat mínima a pH 5-6, una gran capacitat escumant a un interval de pH entre 4 i 8, però una baixa estabilitat de l'escuma si es comparava amb el plasma. També van observar que l'escuma formada amb globina mostrava un petit increment de l'estabilitat a pH 8, enfront al comportament observat a pH inferiors (4 i 6), en els quals es produïa un percentatge de drenatge d'escuma superior.

Contràriament, Tybor *et al.* (1975) van trobar que la globina aïllada de l'Hb bovina presentava unes millors propietats escumants que el plasma i l'albumina d'ou. Van observar que la màxima expansió de l'escuma es produïa a valors de pH d'entre 5 i 6, mentre que a pH 7,2 era mínima, és a dir, el mateix comportament que havien observat en el cas de la solubilitat en funció del pH (la solubilitat proteica de l'aïllat de globina era mínima a pH neutre i màxima a valors de pH < 6). Aquests resultats no coincideixen amb els perfils típics de la solubilitat i les propietats escumants en funció del pH observats per altres autors i amb els nostres resultats en què, a pH neutre (PIE), l'Hb presenta una menor solubilitat proteica i una major capacitat escumant, mentre que a pH 4,5 hem observat el comportament invers. Pot ser que el tractament químic aplicat a l'Hb per aquests autors hagi modificat el seu comportament funcional.

4.4.5.3 Activitat emulsionant

L'activitat emulsionant d'una proteïna fa referència a la capacitat d'una proteïna de participar en la formació d'emulsions O/W i W/O i d'estabilitzar les emulsions formades. L'efecte estabilitzant de les proteïnes als sistemes emulsionats es deu a la formació d'una barrera protectora al voltant de les gotes de la fase dispersa, que la protegeix dels fenòmens de floculació i coalescència (Zayas, 1997).

Les propietats emulsionants de les proteïnes es poden definir en termes de capacitat emulsionant (CE), estabilitat de l'emulsió (EE) i activitat emulsionant (AE). La CE mesura la màxima quantitat d'oli (mL) que s'emulsiona per una quantitat estàndard de proteïna sota unes condicions determinades; la EE normalment es mesura com la quantitat d'oli que es separa d'una emulsió durant un període determinat de temps i a temperatura constant, o com el temps necessari per a què es produeixi un determinat grau de separació de les fases; i la AE està directament relacionada amb la l'àrea interfasial de l'emulsió recoberta per la proteïna disponible. La capacitat d'una proteïna de formar una emulsió està relacionada amb la seva capacitat d'adsorció i d'estabilització de la interfase oli-aigua i l'estabilitat de l'emulsió està relacionada amb la constància de l'àrea interfasial. La teoria de Mie pel pas de la llum difusa a través de partícules esfèriques disperses indica que existeix una relació senzilla entre la turbidesa i l'àrea interfasial d'una emulsió (Pearce i Kinsella, 1978).

L'activitat emulsionant a pH 4,5 i pH 7 de la FC no tractada en pols i de la FC tractada per HHP i deshidratada per atomització es mostra en la Figura 4.20. Es mostren els valors de l'absorbància (500 nm) en funció de la concentració de FC (p/v) en la fase proteica aquosa de l'emulsió.

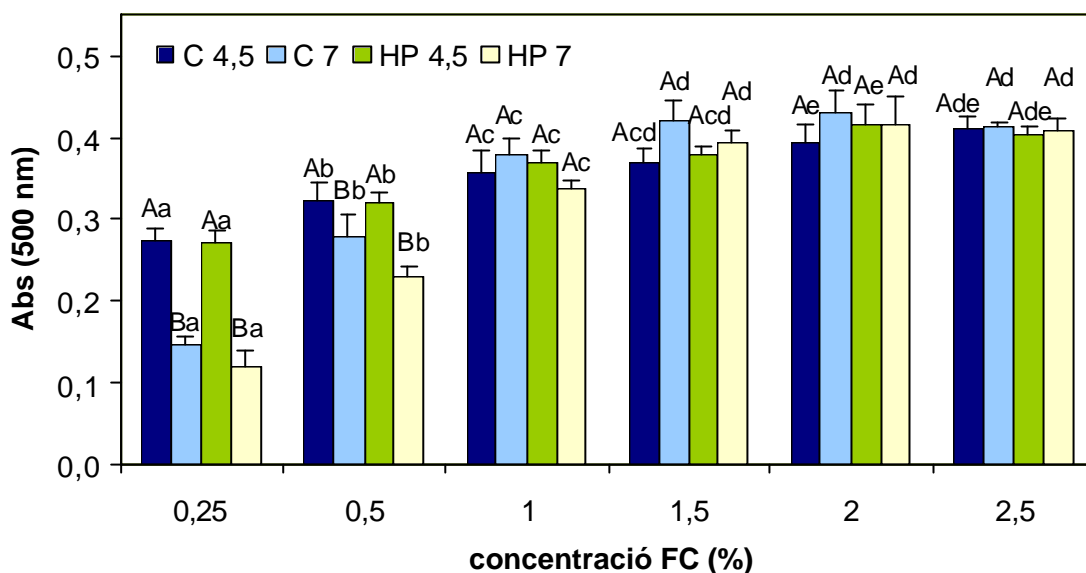


Figura 4.20: Activitat emulsionant (absorbància a 500 nm) a pH 4,5 i pH 7 de la FC tractada per HHP i la FC no tractada (control) deshidratades per atomització en funció de la concentració de FC (p/v). Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del pH dins de cada concentració (majúscules) i per a l'efecte de la concentració dins de cada pH (minúscules).

L'ANOVA va mostrar l'existència de diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte de la concentració de FC sobre l'activitat emulsionant, tant a pH 7 com a pH 4,5, malgrat que el comportament observat a cada pH era diferent. A pH àcid, l'activitat emulsionant observada amb concentracions baixes de FC en pols (0,25 i 0,5 %) era significativament superior que a pH neutre per a les mateixes concentracions però, a partir de l'1 % de FC, no existeixen diferències significatives ($P>0,05$) entre l'activitat emulsionant a diferents pHs. Això es pot justificar pel fet que, al PIE, l'Hb pot formar una estructura més rígida i estable que és més resistent al desplegament necessari per formar la pel·lícula interfasial, mentre que al disminuir el pH incrementa la solubilitat de l'Hb. En canvi, una major concentració de proteïna a la interfase pot permetre que es formin els films interfasials i, per això, no observem diferències entre els 2 pHs.

Algunes proteïnes tenen unes propietats emulsionants òptimes al seu PIE (clara d'ou, gelatina), mentre que altres emulsionen millor a valors de pH allunyats del PIE (proteïnes de la soja i del cacauet). La influència del pH sobre les propietats emulsionants de les proteïnes està relacionada amb els efectes sobre la seva solubilitat, conformació i les propietats de superfície (Zayas, 1997). Nakamura *et al.* (1984), en un estudi on

comparaven les propietats emulsionants de la globina bovina, obtinguda a partir d'Hb descolorada amb carboximetilcel·lulosa (CMC), amb les de la seroalbúmina, Hb bovina i ovoalbúmina, també van trobar que l'activitat emulsionant de l'Hb disminuïa a pH 7, mentre que l'activitat emulsionant de la globina era superior a la de l'Hb i l'ovoalbúmina, però a pH 7 aquesta era extremadament baixa.

Quant a l'efecte de la concentració de FC sobre l'activitat emulsionant a cada pH per separat, es va observar que l'activitat emulsionant a pH 7 de l'Hb de la FC en pols (pressuritzada i no tractada) incrementava en augmentar la concentració de FC afegida fins a una activitat màxima a concentracions de l'1,5 %; a partir d'aquesta concentració, l'activitat emulsionant s'estabilitzava. El test de separació de mitjanes va separar 4 grups significativament diferents ($P < 0,05$) pel que fa a l'efecte de la concentració sobre l'activitat emulsionant a pH 7: 0,25 %; 0,5 %; 1 %; i el grup de 1,5-2,5 %. A pH 4,5, el test de separació de mitjanes va separar 5 grups, però igualment no existien diferències significatives entre valors de concentració superiors a l'1 %, la qual cosa confirma que, a partir de l'1 % de FC, l'activitat emulsionant no millora en augmentar la concentració de proteïna.

El comportament emulsionant de l'Hb observat en els nostres assaigs és bastant semblant als resultats obtinguts per Nakamura *et al.* (1984), que van exposar que l'activitat emulsionant de l'Hb, mesurada com l'absorbància a 500 nm, incrementava gradualment fins a concentracions de proteïna superiors al 2 %. Per contra, el comportament de la globina era diferent ja que l'activitat emulsionant incrementava linealment fins a concentracions de proteïna del 0,5 % i, a partir d'aquesta concentració, s'estabilitzava.

Pel que fa als efectes del tractament HHP sobre l'activitat emulsionant, l'ANOVA va mostrar que no existien diferències significatives entre la FC control i la sotmesa a altes pressions, en cap de les concentracions estudiades. Per tant, l'alta pressió no afecta les propietats emulsionants de la FC en pols. Per contra, Parés (1998) va observar que la pressurització del plasma (450 MPa, 15 min, 40°C) conduïa a una millora de l'activitat emulsionant a pH 7,4, de la mateixa manera que en el cas de les propietats escumants, fet que va atribuir al desplegament parcial de les proteïnes induït per la pressió.

Altres autors (Denda i Hayashi, 1992) també han descrit una millora de les propietats emulsionants d'algunes proteïnes tractades per HHP. Tot i que la pressurització millorava l'activitat emulsionant i l'estabilitat de l'emulsió de l'ovoalbúmina a pH 12,5, després de la pressurització van observar una disminució de l'activitat emulsionant i de la solubilitat a pH 5,5, prop del PIE de l'ovoalbúmina. En canvi, la pressurització de la caseïna i l'albúmina sèrica bovina no millorava significativament les seves propietats emulsionants perquè la seva estructura és més resistent als efectes de l'alta pressió. Per tant, les propietats emulsionants de determinades proteïnes es poden millorar mitjançant l'alta pressió, en

condicions adequades de pH i temperatura, com a resultat d'una desnaturalització proteica parcial. Tanmateix, un excés de desnaturalització proteica causada per la pressurització al voltant del PIE produeix una insolubilització i té efectes adversos sobre les propietats emulsionants.

Galazka *et al.* (1995) van investigar els efectes de l'alta pressió (fins a 800 MPa, durant 10, 20 i 40 min) sobre el comportament emulsionant de les proteïnes del sèrum de la llet, i van observar una disminució de l'eficiència emulsionant en augmentar la pressió i el temps de pressurització, que van atribuir fonamentalment a modificacions de l'estructura nativa de la β -lactoglobulina que conduïen a la formació d'agregats proteics després del tractament. Segons Felipe *et al.* (1997), la β -lactoglobulina és més susceptible a la pressió que altres proteïnes del sèrum de la llet. Pittia *et al.* (1996) també van trobar que la β -lactoglobulina pressuritzada presentava unes capacitats emulsionant i escumant inferiors a les de les mostres control, mentre que incrementava la seva capacitat de formació d'interaccions proteïna-proteïna a les capes adsorbides a la interfase. El tractament HHP de la β -lactoglobulina induïa una desnaturalització parcial de la molècula, la qual incrementava les seves característiques hidrofòbiques i la formació d'agregats proteics. Aquests canvis estructurals tenien efectes negatius sobre les propietats de superfície d'aquesta proteïna.

Adapa *et al.* (1997) van investigar les propietats funcionals de la llet desnatada processada per alta pressió i van exposar que la llet no concentrada pressuritzada presentava una millor estabilitat emulsionat que la llet concentrada pressuritzada. En la llet concentrada, amb un contingut en proteïnes més elevat, l'alta pressió afavoria les interaccions proteïna-proteïna i la formació d'agregats proteics de mida gran que no eren tan efectius per adsorbir-se a la interfase i formar una capa al voltant dels glòbuls grassos, la qual cosa indicava que existeix una quantitat crítica d'agregació proteica que afavoreix l'estabilitat de l'emulsió. En canvi, concentracions de proteïna per sobre d'aquest nivell són desfavorables.

4.4.5.4 Textura (TPA) i capacitat de retenció d'aigua (CRA) de les pastes obtingudes per escalfament

Les reaccions d'associació de proteïnes fan referència a les modificacions que es produeixen a nivell de subunitats o de la molècula, mentre que les reaccions de polimerització o agregació impliquen la capacitat de formar complexes de més grandària. La precipitació inclou totes les reaccions d'agregació que condueixen a una pèrdua total o parcial de la solubilitat. La floculació es deu a reaccions d'agregació de forma desordenada que es produeixen sense desnaturalització i com a conseqüència de la desaparició de forces electrostàtiques de repulsió entre cadenes. Per altra banda, la coagulació és l'agregació no ordenada que es produeix amb desnaturalització, en la qual

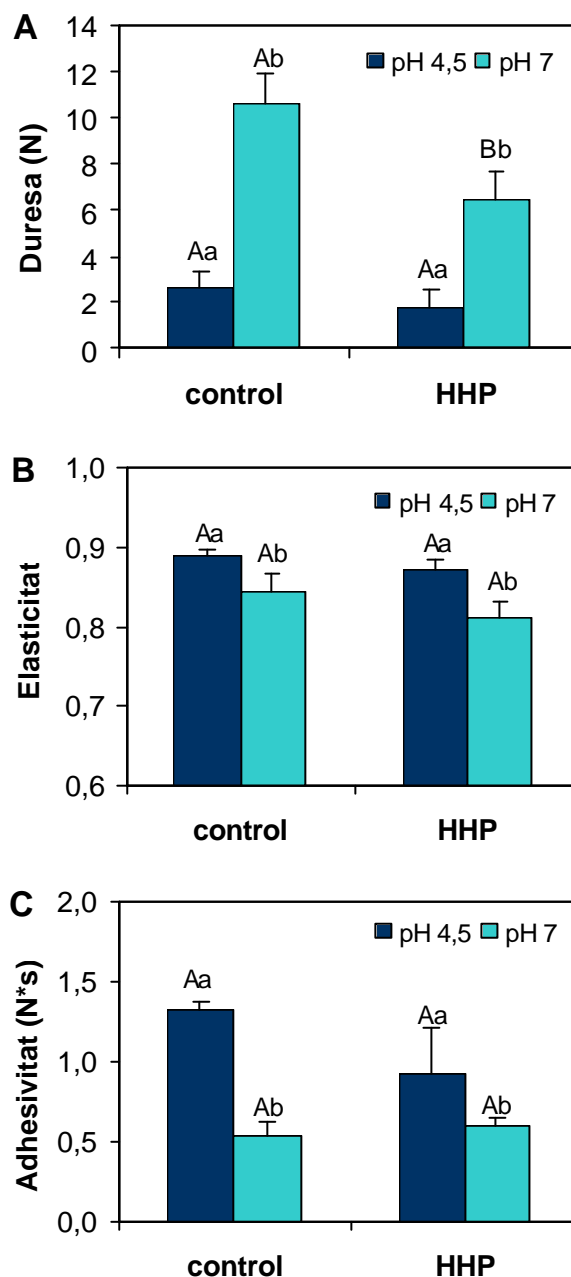
predominen les reaccions d'agregació o les interaccions proteïna-proteïna enlloc de les proteïna-dissolvent; per contra, a la gelificació, les molècules desnaturalitzades s'agreguen per formar una xarxa proteica tridimensional ordenada (Cheftel, 1989). L'absorció i la capacitat de retenció d'aigua dels ingredients proteics té un paper fonamental en la qualitat de la textura de diversos aliments, especialment en productes carnis que s'han de tractar tèrmicament i a les pastes de panificació. La retenció d'aigua sense dissolució de la proteïna condueix a un inflament i li confereix propietats com consistència, espessiment, viscositat i adherència. També disminueix l'exsudació d'aigua i, per tant, evita l'assecament i les pèrdues de rendiment (mermes després de la cocció) en productes als quals s'afegeixen proteïnes com a ingredients funcionals.

a) Paràmetres del TPA:

Les pastes formades per escalfament amb solucions de FC en pols, tractada per HHP i no tractada, a pH 7 eren molt compactes i consistents, formaven una estructura gelificada sòlida molt ferma semblant a una esponja que, quan es sotmetien a compressió, alliberava l'aigua retinguda però immediatament la tornaven a absorbir. En canvi, a pH 4,5, s'obtenien unes pastes molt viscoses i cohesives, poc consistents i amb una gran capacitat de retenció d'aigua. Els resultats de les determinacions dels paràmetres de l'anàlisi de perfil de textura (duresa, elasticitat i adhesivitat) de les pastes obtingudes a cada pH, es poden observar a les Figures 4.21 A, B i C. Els resultats del TPA posen de manifest les propietats texturals dels 2 tipus de pastes que forma la FC en funció del pH; les pastes que s'obtenien a pH 7 eren més dures, menys elàstiques i menys adhesives que les obtingudes a pH 4,5. Al PIE de l'Hb, l'escalfament afavoreix la formació d'un elevat nombre d'interaccions intermoleculares entre les cadenes polipeptídiques d'Hb desnaturalitzades i això es tradueix en l'obtenció d'una pasta o estructura gelificada molt més compacta i resistent a la compressió.

En general, l'aplicació del tractament amb altes pressions hidrostàtiques a la FC produïa una disminució dels valors dels 3 paràmetres de textura de les pastes (duresa, adhesivitat i elasticitat). Tanmateix, l'ANOVA va mostrar que l'alta pressió no tenia efectes significatius sobre els paràmetres elasticitat i adhesivitat de les pastes als 2 pHs assajats. En canvi, la duresa de les pastes, mesurada com la resistència que ofereix la pasta a la compressió, era significativament diferent ($P < 0,05$) entre mostres tractades per HHP i no tractades. Tot i així, el test de separació de mitjanes va mostrar que no existien diferències en la duresa entre les pastes formades a partir de FC tractada i les de FC control; per tant, es van investigar els efectes de l'alta pressió sobre la duresa de les pastes a cada pH per separat. Es va trobar que només a pH 7, les pastes obtingudes amb FC tractada presentaven una menor resistència a la compressió ($P < 0,05$) que les de FC control. El fet que per a la formació d'escumes, emulsions i gels s'hagin de produir fenòmens de desplegament, agregació i insolubilització de la proteïna fa que, algunes vegades, la capacitat de gelificació es mantingui després de la desnaturalització i

insolubilització proteica parcial (Cheftel *et al.*, 1989). Per altra banda, el pH sí que tenia efectes significatius ($P < 0,05$) sobre els 3 paràmetres de textura. La duresa era significativament superior en les pastes formades amb solucions de FC a pH 7 que a pH 4,5. Per contra, les pastes formades per escalfament de la FC a pH àcid eren més elàstiques i adhesives que les de pH neutre.



Figures 4.21 A, B i C: Paràmetres del TPA de les pastes obtingudes a pH 4,5 i pH 7 amb FC tractada per HHP i FC no tractada (control) en pols. **(A)** Duresa; **(B)** Elasticitat (*Springiness*); **(C)** Adhesivitat. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P < 0,05$) per a l'efecte del tractament (majúscules) i el pH (minúscules).

Les atraccions intermoleculares i la gelificació es produeixen més ràpidament amb concentracions elevades de proteïna perquè s'afavoreix el contacte intermolecular. La zona de pH en la que es produeix la gelificació s'eixampla en augmentar la concentració proteica perquè es formen un gran nombre d'interaccions hidrofòbiques i ponts disulfur, que poden compensar les forces electrostàtiques de repulsió induïdes per l'alta càrrega neta de la proteïna a un pH allunyat del PIE. En el PIE, l'absència de forces elèctriques de repulsió condueix a la formació d'un gel menys expandit i menys hidratat. Les proteïnes que presenten un elevat percentatge d'aminoàcids hidròfobs (més del 31,5 %), com l'Hb i l'ovoalbúmina, en general tenen zones de pH de gelificació dependents de la concentració proteica, mentre que les que tenen pocs aminoàcids hidrofòbics (22-31,5 %), tals com la seroalbúmina del plasma, globulines, gelatina i les proteïnes de la soja, no presenten modificacions de la zona de pH de gelificació quan la concentració de proteïna varia (Cheftel *et al.*, 1989).

b) Capacitat de retenció d'aigua (CRA):

Pel que fa a la capacitat de retenció d'aigua (CRA) de les pastes formades per escalfament de solucions de FC en pols, a la Figura 4.22 es mostren els resultats de les determinacions del percentatge d'aigua retinguda a pH 4,5 i a pH 7 de les pastes de FC en pols tractada per HHP i no tractada.

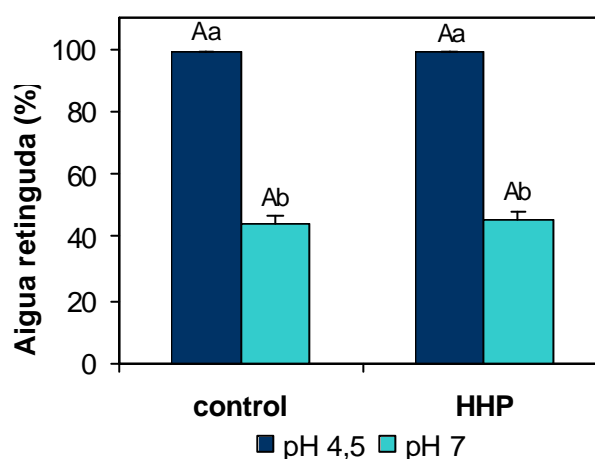


Figura 4.22: Capacitat de retenció d'aigua (% d'aigua retinguda) a pH 4,5 i pH 7 de les pastes obtingudes amb FC tractada per HHP i FC no tractada (control) deshidratades per atomització. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del tractament (majúscules) i el pH (minúscules).

L'aplicació de l'alta pressió a la FC no afectava la capacitat de retenció d'aigua de les pastes, de manera que el % d'aigua retinguda a les pastes formades amb FC pressuritzada i no tractada en pols no era significativament diferent ($P > 0,05$). En canvi, el pH sí que tenia efectes significatius ($P < 0,05$) sobre la CRA. Les pastes de FC a pH 4,5 retenien quasi el 99 % de l'aigua, mentre que a pH 7 el percentatge d'aigua retinguda era del 45 %, independentment de si la FC s'havia pressuritzat o no abans de la deshidratació. Els valors de la CRA de les pastes de FC no tractada i FC pressuritzada deshidratades, en funció del pH, estan directament relacionades amb la textura d'aquestes. Òbviament, la conformació proteica i la càrrega tenen una influència directa sobre la CRA de les pastes de FC. A pH àcid, l'Hb està completament hidratada i la desnaturalització tèrmica indueix la formació d'una pasta espessa i viscosa amb una excel·lent capacitat de retenció d'aigua. En canvi, a pH neutre (PIE), es forma una pasta molt consistent com a conseqüència de l'agregació de les molècules d'Hb desnaturalitzades, en la qual l'aigua està retinguda per capil·laritat a l'interior dels porus de la xarxa proteica.

4.5 CONCLUSIONS

De les diferents condicions d'aplicació del tractament HHP sobre la FC assajades, es considera que les millors són 400 MPa a 20°C de temperatura durant 15 minuts perquè produeixen una millora significativa de la qualitat microbiològica. L'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica permet una reducció de la microbiota contaminant de la FC d'entre 2 i 3 unitats logarítmiques. Per tant, aquest tractament és una tecnologia eficaç per higienitzar la FC de la sang de porc i millorar la seva qualitat microbiològica. Aquestes condicions de tractament no afecten negativament al color, no comprometen gaire la solubilitat proteica de l'Hb i, malgrat que produeixen un augment de la viscositat, la FC roman fluida després del tractament.

L'aplicació del processament per HHP i la posterior deshidratació per atomització permeten obtenir un producte en pols amb recomptes totals de l'ordre de 2,8 unitats logarítmiques. El color de la FC pressuritzada en pols és igual que el de la FC control deshidratada, com a conseqüència del fet que ambdues mostres són igual de susceptibles a l'oxidació del grup hemo produïda per la deshidratació.

Pel que fa als efectes del tractament HHP sobre les propietats funcionals de l'Hb de la FC deshidratada per atomització, l'alta pressió incrementa la susceptibilitat de l'Hb als efectes desnaturalitzants de la deshidratació, fonamentalment a pH 7 (PIE), ja que s'ha observat una disminució de la solubilitat proteica a pH neutre de la FC després dels 2 processos tecnològics.

La FC en pols presenta una màxima capacitat escumant al PIE de l'Hb. L'aplicació del tractament HHP produeix una disminució de la capacitat escumant de la FC, però no té efectes negatius sobre l'estabilitat de l'escuma formada. D'altra banda, el tractament HHP tampoc té efectes negatius sobre l'activitat emulsionant de l'Hb. La màxima activitat emulsionant de l'Hb s'aconsegueix amb una concentració de FC en pols de l'1,5 % a pH 7 i de l'1 % a pH 4,5.

Les pastes obtingudes per escalfament de la FC presenten característiques molt diferenciades depenent del pH. A pH neutre es formen unes pastes dures i consistents, mentre que a pH àcid les pastes són poc consistents, molt adhesives i més elàstiques que les anteriors. Aquestes tenen, a més, una capacitat de retenció d'aigua molt superior que les de pH 7, en les quals, l'aigua queda retinguda per capil·laritat. La textura i capacitat de retenció d'aigua de les pastes tampoc es veuen afectades pel tractament d'alta pressió.

Capítol 5: Obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats a partir de fracció cel·lular

5.1 INTRODUCCIÓ

El principal factor limitant per a la utilització de la fracció cel·lular en molts productes alimentaris és la seva pigmentació vermella fosca. Conseqüentment, si es vol utilitzar l'Hb com a un ingredient alimentari, és necessari sotmetre-la a algun procés de descoloració o a alguna manipulació tecnològica a fi i efecte d'emascarar el color fosc que proporciona la presència del grup hemo. En aquest context, diversos autors han proposat diferents procediments de descoloració de la FC, basats en la ruptura de la unió entre els dos components de l'Hb, per poder utilitzar la globina descolorada com a additiu alimentari.

Cocuff *et al.* (1985) van fer una revisió de les possibles estratègies de descoloració mitjançant diferents tractaments químics o enzimàtics. La primera etapa del procés es pot realitzar per via química, gràcies a la sensibilitat del lligam hemo-proteïna a pH àcid, o per via enzimàtica, per l'acció d'enzims proteolítics que catalitzen el trencament a nivell de la unió de l'hemo amb els aminoàcids de la cadena proteica de la globina. En la segona etapa del procés, per separar la globina del grup hemo, es pot utilitzar la seva diferència de solubilitat en dissolvents orgànics, agents adsorbents, la diferència de pes molecular (centrifugació) o la diferència de volum hidrodinàmic (ultrafiltració).

Tybor *et al.* (1975), Dill i Landmann (1988) i Liu *et al.* (1996, 1997) van descriure procediments per obtenir la globina descolorada basats en la separació i eliminació del grup hemo mitjançant la utilització d'agents desnaturalitzants, com l'acetona acidificada o l'alcohol. La proteïna no és soluble en els solvents orgànics i precipita, mentre que el grup hemo roman en la solució. Altres mètodes estan basats en la descoloració amb peròxid d'hidrogen, fet que produeix una oxidació de l'Hb a una forma quasi incolora o lleugerament marronosa; després, l'excés de peròxid s'ha d'eliminar amb l'addició de l'enzim catalasa (Wismer-Pedersen, 1988). Segons Yang i Lin (1998), la funcionalitat dels aïllats de globina tractats amb acetona-àcid i peròxid d'hidrogen no és dolenta, però aquests tractaments presenten el risc d'afegir residus perillosos al producte. L'acetona s'ha d'eliminar i el peròxid d'hidrogen pot formar aminoàcids oxidats, els quals poden ser inhibidors del creixement.

Altres alternatives per a la descoloració estan basades en la separació de l'hemo de la globina per absorció en un medi en contacte amb una solució acidificada d'Hb. Com a agents adsorbents s'han proposat la carboximetilcel·lulosa (CMC) soluble (Autio, 1983; Autio *et al.*, 1984), una cromatografia en columna de CMC (Sato *et al.*, 1981), la

carboximetilcel·lulosa sòdica (Hayakawa *et al.*, 1982, 1986) i l'alginat sòdic (Lee *et al.*, 1990) o el carbó actiu. Yang i Lin (1996) van examinar els efectes dels espesseïdors carboximetilcel·lulosa sòdica (Na-CMC), alginat de propilenglicol (APG) i alginat sòdic (AS) i el pH, en el procés de separació del grup hemo de la FC de la sang de porc i en la distribució del Fe^{2+} entre els extractes de les fraccions hemo i no-hèmica. Van concloure que la Na-CMC era més eficaç que els altres polisacàrids per separar la fracció hemo a pH àcid (1,5-2), donat que aquest material presentava un major grau de polimerització i s'afavorien les interaccions electrostàtiques d'adsorció entre el Fe i el polisacàrid.

Els mateixos autors, en un treball posterior (Yang i Lin, 1998), on van comparar els efectes del pH sobre varies propietats funcionals de diferents tipus de globina de sang de porc liofilitzada que s'havien obtingut pels mètodes de descoloració amb Na-CMC, acetona-àcid, peròxid d'hidrogen o mitjançant tractament enzimàtic amb Alcalasa, van concloure que, si es considerava conjuntament l'efectivitat relativa de descoloració i les propietats funcionals dels diferents aïllats de globina, els millors mètodes de cara a una producció comercial serien el tractament amb Na-CMC i la hidròlisi amb Alcalasa. Tanmateix, diuen que aquests tractaments són parcialment eficaços quant a la disminució del color marró fosc de la FC, donat que la globina obtinguda encara contenia una quantitat considerable de grup hemo i, com que la seva funcionalitat és molt pobre, s'hauria de millorar mitjançant alguna modificació química o enzimàtica addicional.

Nosaltres vàrem portar a terme uns assaigs previs amb l'objectiu de descolorar l'Hb de la FC mitjançant el procediment d'adsorció del grup hemo amb l'agent adsorbent Na-CMC (Autio, 1983; Autio *et al.*, 1984; Hayakawa *et al.*, 1986; Yang i Lin, 1996, 1998). Es van preparar solucions de FC en aigua destil·lada, amb una concentració de proteïna del 5 % (p/v) i es van ajustar a pH àcid (1,5) amb HCl. Les solucions es van sotmetre a escalfament a 77°C durant 10 min, i es va afegir una solució de Na-CMC per tenir diferents concentracions (1 %, 1,5 % i 2 %) de l'agent adsorbent a les solucions d'Hb desnaturalitzada tèrmicament. Les solucions amb Na-CMC, amb un pH final de 2,3, es mantenien en agitació durant 30 min i a 20°C. Finalment, es centrifugaven a 2000 x g durant 10 min i a 15-20°C, amb l'objectiu de separar una solució d'Hb descolorada (sobrenedant) del residu compostat pel grup hemo adsorbit a la Na-CMC. Després de la centrifugació, es determinava el percentatge de recuperació de proteïna i el contingut en hemo residual (%) al sobrenedant.

Es va observar que el procediment de la CMC sòdica tenia molt poca eficàcia pel que fa a la capacitat de descoloració de la FC. Aquesta encara contenia entre un 6 i un 20 % de grup hemo, i, a més, es perdia entre un 63 i un 32 % del contingut en proteïna original. De manera que, a partir dels resultats negatius observats, es van descartar les possibilitats d'aplicació d'aquest mètode com a sistema d'eliminació del grup hemo i es va començar a treballar en la descoloració de la FC mitjançant hidròlisi enzimàtica.

Entre els diferents mètodes d'obtenció de globina descolorida, la hidròlisi enzimàtica sembla la millor opció quant a l'aplicació pràctica a escala industrial (Houlier, 1986; a: Uchman *et al.*, 1994). Els enzims presenten l'avantatge d'una rapidesa de reacció en condicions suaus de temperatura i pH i la seva especificitat per a un tipus determinat d'enllaç. En canvi, els tractaments químics no són tan indicats per a les aplicacions alimentàries donat que les condicions de reacció són més agressives, les reaccions químiques no són tan específiques i les dificultats relacionades amb l'eliminació de reactius residuals presents al producte acabat (Biotimes, 2002, Novozymes, Novo A/S).

La hidròlisi de proteïnes alimentàries es porta a terme per diversos motius: per millorar característiques funcionals, endarrerir el deteriorament, proporcionar textura, incrementar o disminuir la solubilitat, conferir propietats escumants, emulsionants o de coagulació, desenvolupar aromes particulars, prevenir interaccions indesitjables, eliminar olors o *flavours* no desitjats, minimitzar l'al·lergicitat, i eliminar ingredients tòxics d'una proteïna determinada. A mida que incrementa el grau d'hidròlisi de les proteïnes, aquestes donen lloc a fragments peptídics de pes molecular cada cop més petit, incloent proteoses, peptones, barreges de pèptids i aminoàcids, i aminoàcids lliures. La hidròlisi proteica es pot realitzar mitjançant enzims, àcids o bases, malgrat que la hidròlisi enzimàtica és preferible a la utilització de mètodes estrictament químics quan es volen obtenir hidrolitzats per a aplicacions nutricionals. La hidròlisi àcida o alcalina pot destruir els L-aminoàcids, produir D-aminoàcids i formar substàncies tòxiques (Lahl i Braun, 1994).

Les proteïnes més utilitzades per obtenir productes nutricionals i/o funcionals que continguin hidrolitzats proteics són les caseïnes, proteïnes del lactosèrum i de la soja. També s'han utilitzat col·lagen, gelatina, ovoalbúmina, carn, peix, gluten, arròs, patata, i proteïnes microbianes, però no tant com les anteriors.

Existeixen alguns estudis centrats en procediments de descoloració de la FC mitjançant la hidròlisi enzimàtica de l'Hb amb l'objectiu d'eliminar el grup hemo per evitar el problema de l'enfosquiment. La hidròlisi enzimàtica consisteix en induir l'hemòlisi dels eritròcits mitjançant un xoc osmòtic, seguit d'un tractament amb proteases a pH i temperatura controlats. Posteriorment, l'enzim s'inactiva i s'obté una fracció insoluble que conté el grup hemo. La fracció soluble està composta pels pèptids de baix pes molecular i els aminoàcids lliures resultants, que es poden separar del grup hemo mitjançant ultrafiltració o centrifugació, per incorporar-los a productes carnis en forma d'hidrolitzats proteics (Ockerman i Hansen, 1994). Aquesta fracció soluble també es pot purificar més amb carbó actiu i, finalment, concentrar-la i assecar-la. Les condicions de tractament mantenen quasi intactes els aminoàcids i es pot regular el grau d'hidròlisi i, per tant, la composició i les propietats funcionals del producte final (Rodríguez, 1994).

Existeixen diferents enzims proteolítics que es poden utilitzar per a la producció d'hidrolitzats. L'Alcalasa[®] és una preparació enzimàtica comercial que ha estat utilitzada

estesament en la producció d'hidrolitzats proteics a causa de la seva termoestabilitat (50°C) i a l'elevat pH òptim d'actuació (pH 8,5), els quals poden minimitzar el desenvolupament de microorganismes. Un altre avantatge d'utilitzar l'Alcalasa és que permet una hidròlisi intensa donant lloc a uns hidrolitzats amb menor gust amarg si es comparen amb els obtinguts amb altres enzims (Liceaga-Gesualdo i Li-Chan, 1999).

Olsen (1985), de l'empresa Novo Industri A/S, va desenvolupar l'aplicació a escala de planta pilot de la hidròlisi de la FC de la sang d'escorxadador amb Alcalasa, per obtenir hidrolitzats proteics que es poden incorporar a productes carnis. Proposa un grau d'hidròlisi del 18-20 %, on s'obté una solució final fosca que, mitjançant ultrafiltració o per centrifugació decantadora de sòlids, es pot separar en una solució de color marró clar i un residu fosc que conté el grup hemo insoluble. L'hidrolitzat s'ha d'acabar de purificar amb un tractament amb carbó actiu durant 60 min a pH 4,5-5 i 55°C. El carbó s'elimina per filtració i l'hidrolitzat descolorit es pot concentrar fins al 50 % per evaporació o per osmosi inversa i deshidratar-lo per atomització.

Altres autors també han assajat la hidròlisi de la FC i d'altres fonts de proteïnes amb Alcalasa[®]. Synowiecki *et al.* (1996) van preparar hidrolitzats proteics a partir de la FC de sang bovina amb Alcalasa segons el mètode desenvolupat per l'empresa Novo Industri A/S (Olsen, 1985). Aquests van escollir l'Alcalasa perquè presenta especificitat per aminoàcids hidrofòbics terminals, i això semblava que permetria la producció d'hidrolitzats no amargants (Adler-Nissen, 1986, a: Synowiecki *et al.*, 1996). Tanmateix, aquests hidrolitzats de FC presentaven un intens gust amarg, directament relacionat amb el grau d'hidròlisi i amb l'aparició de pèptids amb regions hidrofòbiques. Per aquest motiu, van proposar un sistema per reduir l'amargor dels hidrolitzats de FC mitjançant la reacció de la plasteïna. Aquesta reacció consisteix en formar una "plasteïna" a partir d'un hidrolitzat proteic mitjançant un enzim determinat. La plasteïna és una substància proteica d'elevat pes molecular amb propietats diferents a les de la proteïna original i que no té cap *flavour* particular (Perdersen, 1994). La reacció de la plasteïna es va fer a 37°C i pH 5,5 durant 24 h, utilitzant Papaïna i afegint éster dietílic de l'àcid glutàmic. L'aplicació de la reacció de la plasteïna va permetre incorporar l'àcid glutàmic als pèptids dels hidrolitzats per disminuir la proporció d'aminoàcids hidrofòbics i, per tant, reduir en un 50 % l'amargor dels hidrolitzats de FC bovina i millorar el gust del producte.

Liceaga-Gesualdo i Li-Chan (1999) també van proposar un procediment d'obtenció d'hidrolitzats proteics a partir de proteïnes del peix amb l'Alcalasa. En aquest cas, l'objectiu era incrementar el valor econòmic potencial d'alguns subproductes de l'arengada (*Clupea harengus*) mitjançant l'obtenció de productes amb un bon perfil d'aminoàcids essencials i bones propietats funcionals. Van portar a terme la hidròlisi amb Alcalasa a 50°C i a pH 8,0 durant 60 min, fins a un grau d'hidròlisi del 36 % que permetia l'obtenció d'un hidrolitzat de proteïnes del peix amb unes bones propietats emulsionants i escumants.

Uchman *et al.* (1994) exposen algunes propietats de la globina obtinguda per descoloració enzimàtica de la FC mitjançant hidròlisi amb el preparat enzimàtic PROTEPOL BPS (complex enzimàtic obtingut a partir de *Bacillus subtilis* i compostat per una barreja d'enzims proteolítics i amilolítics). Les condicions d'hidròlisi eren pH 4 i 45°C, i van provar diferents concentracions d'enzim, relació enzim/substrat de 5, 10 i 20 mL de la preparació enzimàtica per 100 g de FC (35 % de proteïna), i temps d'hidròlisi (durant 6, 18 i 48 hores). Van trobar que les millors condicions quant al grau de descoloració eren 10 mL d'enzim per 100 g de FC i 18 h de reacció. La globina hidrolitzada sota aquestes condicions i liofilitzada presentava una bona solubilitat i molt bones propietats emulsionants i escumants, comparables a les del plasma deshidratat per atomització i el caseïnat sòdic.

Aubes-Dufau i Combes (1997) van estudiar la utilització de diferents proteases (Pepsina, Proctasa, Papaïna, Alcalasa i Neutrasa) per obtenir hidrolitzats d'Hb bovina i van determinar la seva influència sobre la formació de gustos amargants als diferents tipus d'hidrolitzats obtinguts. Els hidrolitzats obtinguts amb Papaïna i Neutrasa no contenien pèptids amargs, o no en una quantitat suficient com per produir amargor, mentre que en el cas dels hidrolitzats obtinguts amb Pepsina, Alcalasa i Proctasa es van aïllar pèptids amargs. Van trobar que tots els pèptids amargants pertanyien a un mateix fragment de la cadena beta de l'Hb bovina. Aquest autors recomanen que si es volen obtenir hidrolitzats d'Hb per a fórmules alimentàries, preferentment s'hauria d'utilitzar la Papaïna o la Neutrasa. També es podrien afegir hidrolitzats obtinguts amb Proctasa o Alcalasa, però en aquest cas, s'haurien d'afegir compostos que emmascaressin el gust amarg. Per altra banda, van excloure la possibilitat d'utilitzar la Pepsina per hidrolitzar l'Hb bovina, donat que els hidrolitzats pèpsics eren el doble d'amargants que els altres.

5.2 OBJECTIUS

L'objectiu del present capítol és obtenir fracció cel·lular descolorida mitjançant hidròlisi enzimàtica. Amb aquesta finalitat, s'assajaran diferents enzims proteolítics, en diferents concentracions i temps de reacció, en condicions controlades de temperatura i pH. Es pretén aconseguir la descoloració de l'Hb, separant el grup hemo (responsable del color vermell-marró de la molècula) de la part proteica (globina), hidrolitzant el mínim possible les 4 globines de la molècula, per tal que la proteïna mantingui les propietats funcionals.

A continuació es mostra el procediment que es portarà a terme, en l'ordre cronològic en què es realitzarà, per obtenir hidrolitzats proteics descolorats a partir de la FC:

- a) Obtenció de globina descolorida i hidrolitzats de l'hemoglobina amb la utilització de diferents enzims proteolítics. A partir de la informació bibliogràfica, s'assajaran diferents proteases que, en principi, sembla que ens permetran assolir els nostres objectius. Es seleccionaran els enzims més eficaços pel que fa a la capacitat de descoloriment de l'Hb.
- b) Estudiar els efectes de l'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre el procés d'obtenció d'hidrolitzats proteics de l'Hb. Les altes pressions hidrostàtiques indueixen fenòmens de desnaturalització en l'Hb i poden produir l'activació d'alguns enzims. Ambdós factors determinen que el tractament HHP pot tenir efectes favorables sobre el procés d'hidròlisi enzimàtica de la FC.
- c) Un cop trobat el millor sistema per obtenir els hidrolitzats descolorats de l'Hb de la FC, es determinaran les millors condicions per deshidratar per atomització els hidrolitzats de FC i es portarà a terme la caracterització físico-química i microbiològica de l'hidrolitzat d'Hb en pols.
- d) Finalment, es determinaran les principals propietats funcionals dels hidrolitzats descolorats d'Hb deshidratats per atomització i es compararà la seva funcionalitat amb la de la FC deshidratada.

5.3 MATERIAL I MÈTODES

5.3.1 Procedència de les mostres

Les mostres de FC hemolitzada es van obtenir segons el procediment descrit a l'apartat 2.3.3. Tots els experiments es van realitzar amb mostres de sang de porc recollides en diferents dies però en les mateixes condicions. Les mostres de FC hemolitzada sempre es van sotmetre al procés d'hidròlisi enzimàtica el mateix dia d'haver recollit la sang i es mantenien en refrigeració fins al moment del tractament enzimàtic.

5.3.2 Enzims proteolítics utilitzats per hidrolitzar l'hemoglobina

Els enzims proteolítics es poden classificar en funció de la seva especificitat per l'enllaç peptídic que hidrolitzen i el mecanisme pel qual actuen. Existeixen dos grups principals de proteases: les endoproteases, que hidrolitzen els enllaços peptídics de l'interior de la cadena proteica a l'atzar, i les exoproteases, que tallen els enllaços peptídics dels aminoàcids situats als extrems de la cadena polipeptídica. Per tant, les exoproteases permeten l'obtenció d'aminoàcids quan degraden una proteïna, mentre que les

endoproteases produeixen pèptids. A continuació, es descriuen els diferents enzims proteolítics que es van utilitzar i a la Taula 5.1 es mostren les condicions òptimes de pH i temperatura d'actuació d'aquests.

Taula 5.1: Enzims proteolítics utilitzats en l'obtenció d'hidrolitzats proteics de l'hemoglobina i condicions òptimes de reacció.

<i>Enzim</i>	<i>tipus de proteasa</i>	<i>pH òptim</i>	<i>temperatura (°C)</i>
Alcalasa ®	Serina-proteinasa	6,5-8,5	50-60
Neutrasa ®	Metalo-proteinasa	5,5-7,5	45-55
Papaïna	Sulfhidril-peptidasa	6-8	20-75
Plasmina	Serina-proteinasa	7,5	37
Tripsina	Serina-proteinasa	7-9	40-50
Pepsina	Aspàrtic-proteinasa	2-4	37-40

Alcalasa® (EC 3.4.21.62) 2,4 L de Novozymes amb una activitat declarada de 2,4 UA/g (essent UA, Unitats Anson*). El seu nom genèric és Subtilisina Carlsberg, però el nom recomanat és Subtilisina (proteasa bacteriana produïda per vàries soques de *Bacillus subtilis* i altres espècies del gènere *Bacillus*). És una endoproteasa serina que hidrolitza les proteïnes amb una especificitat d'espectre ampli per als enllaços peptídics. Aquest enzim s'utilitza a la indústria alimentària per millorar o modificar les propietats funcionals, nutricionals i *flavouritzants* de les proteïnes.

Neutrasa® (EC 3.4.24.28) 0,8 L de Novozymes amb una activitat de 0,8 UA/g. Es tracta d'una proteasa neutra produïda per soques de *Bacillus amyloloquefaciens*. És una metalo-endoproteasa (Zn) que es pot utilitzar quan es volen hidrolitzar les proteïnes a pèptids de forma moderada o extensiva. S'utilitza per millorar les propietats funcionals, nutricionals i *flavouritzants* de les proteïnes, a la indústria dels cereals per disminuir la força de les farines i a la indústria cervesera per extreure proteïnes del malt i l'ordi i per millorar el creixement del llevat.

* L'activitat enzimàtica es mesura en Unitats d'enzim (U), que es defineix com la quantitat d'enzim que catalitza la transformació d'un micromol de substrat per minut sota condicions estàndard de pH, temperatura, etc. L'activitat específica es mesura en termes de puresa o quantitat d'enzim present en Unitats d'enzim/mg proteïna. En els cas dels enzims subministrats per l'empresa Novozymes, la seva activitat declarada està expressada en Unitats Anson per gram (UA/g). Les UA són unitats d'activitat proteolítica no estàndard per a ús industrial, que expressen la concentració de la preparació enzimàtica comercial i que utilitza com a referència una reacció colorimètrica de fenol amb Tirosina. Una UA produeix una hidròlisi equivalent a 1 mil·lequivalent de Tirosina (Novo Nordisk A/S).

Papaïna (EC 3.4.22.2) de 1,8 unitats/mg de sòlid. És una proteasa amb activitat esterasa, obtinguda a partir de làtex de la papaya (*Carica papaya* L.). Hidrolitza les proteïnes amb una especificitat d'espectre ampli, però preferentment per Arg, Lys, Phe-X.

Plasmina (EC 3.4.21.7) de 3,2 unitats/mg sòlid. També s'anomena fibrinasa, fibrinolisisina o trombolisisina i s'obté a partir del plasminogen de la sang mitjançant proteòlisi. Converteix la fibrina en productes solubles. La Plasmina és una endoproteasa serina que talla per Lys i Arg i presenta una selectivitat més alta que la Tripsina.

Pepsina (EC 3.4.23.1) de 596 unitats/mg de sòlid. La Pepsina A és una endopeptidasa predominant als sucus gàstrics dels vertebrats, formada a partir del pepsinogen A mitjançant proteòlisi limitada. Trenca preferentment per aminoàcids hidrofòbics i aromàtics (Phe, Leu i d'altres).

Tripsina (EC 3.4.21.4). Es va utilitzar l'enzim PTN (Tripsina Pancreàtica Novo) 3,0 P de Novozymes amb una activitat de 25000 USP-u/mg. La Tripsina pancreàtica s'aïlla del pàncrees de porcí i d'altres espècies. Trenca els enllaços peptídics preferentment per Arg i Lys.

Els enzims Alcalasa[®], Neutrasa[®] i Tripsina PTN van ser donats per Novozymes A/S (Novo Nordisk A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) i els enzims Papaïna, Plasmina i Pepsina eren de Sigma (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhem, Alemanya).

5.3.3 Hidròlisi enzimàtica

Les reaccions d'hidròlisi enzimàtica es van dur a terme en recipients de vidre que es mantenien en agitació constant sobre una placa calefactora. Durant la reacció es controlaven constantment el pH i la temperatura de la solució, que depenien del tipus d'enzim utilitzat, amb un pHmetre i una sonda de temperatura (ambdós de Crison Instruments, S.A., Alella, Barcelona). El muntatge que es va fer servir per a les reaccions d'hidròlisi es mostra a la Figura 5.1.

El procés de preparació i obtenció dels hidrolitzats va consistir en preparar una solució d'Hb en aigua destil·lada (dilució 1/2, 1/3 o 1/4). La solució es va ajustar al pH òptim d'actuació en funció del tipus d'enzim: pH 8,5 per Alcalasa, pH 7 per Neutrasa, pH 3 per Pepsina, i pH 7,5 per Tripsina, Plasmina i Papaïna. Quan es va arribar a la temperatura òptima de reacció (55°C per Alcalasa; 50°C per Neutrasa, 40°C per Tripsina i Pepsina, i 37°C Plasmina i Papaïna), es va addicionar una determinada concentració d'enzim. Durant el temps que durava la reacció, es controlava constantment la temperatura i es mantenia el pH de la solució per addició de NaOH o HCl. Les reaccions es van aturar mitjançant un increment o una disminució del pH de les solucions per produir una

inactivació enzimàtica irreversible en funció de les proteases utilitzades: pH 5 per Alcalasa, Neutrasa i Pepsina, i pH 4 per Tripsina, Papaina i Plasmina. Finalment, les solucions dels hidrolitzats es van centrifugar a $20.090 \times g$ (Sorvall RC-5C Plus, Dupont Co., Newton, Connecticut, U.S.A.), a 20°C durant 30 min. Després de la centrifugació, es va separar la fracció soluble o hidrolitzat dels fragments de globina que contenen el grup hemo (fracció insoluble o pellet) mitjançant decantació. Les solucions d'Hb hidrolitzada es van mantenir en refrigeració fins que es realitzaven les anàlisis corresponents.

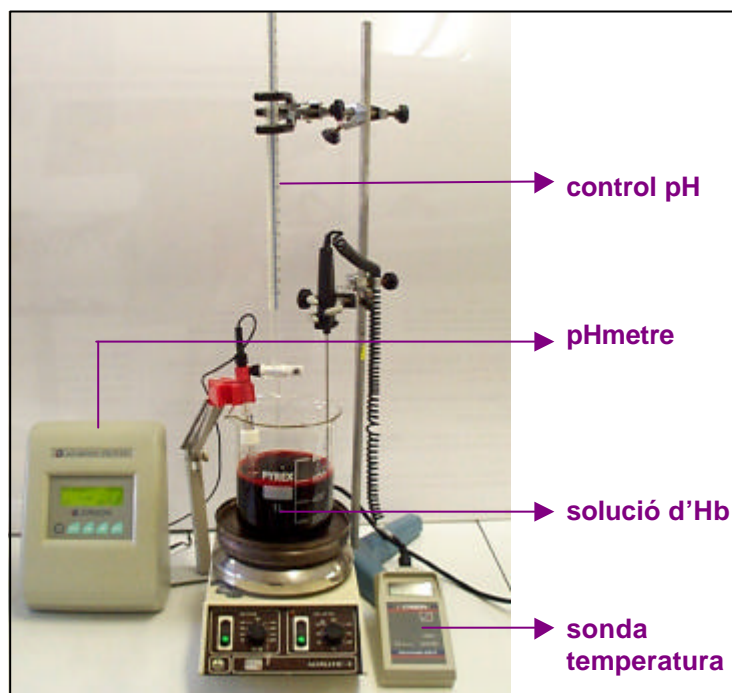


Figura 5.1: Muntatge utilitzat per dur a terme les reaccions d'hidròlisi enzimàtica de la FC.

5.3.4 Grau d'hidròlisi

El grau d'hidròlisi (% GH) és una mesura de l'abast de la degradació hidrolítica d'una proteïna i es defineix com la relació entre el nitrogen amino i el nitrogen total (NA/NT) o el percentatge d'enllaços peptídics trencats (Adler-Nissen, 1979). El GH està considerat com el sistema més pràctic i convenient per controlar un procés d'hidròlisi; a més, també és l'indicador més estès utilitzat per fer comparacions entre diferents hidrolitzats proteics, donat que el GH és el principal determinant de les propietats dels hidrolitzats proteics (Adler-Nissen, 1986 i Mahmoud *et al.*, 1992, a: Mahmoud, 1994).

Existeixen diversos mètodes per mesurar el grau d'hidròlisi, com per exemple: la determinació del nitrogen soluble després de fer precipitar la proteïna amb àcid

tricloracètic (TCA), la valoració del protó alliberat després de la ruptura d'un enllaç peptídic a determinats pHs, i la determinació dels grups α -amino lliures, com el procediment de valoració amb formol i el mètode de l'àcid trinitrobenzensulfònic (TNBS) (Guadix *et al.*, 2000).

El grau d'hidròlisi obtingut als nostres hidrolitzats es va determinar pel procediment del TNBS descrit per Adler-Nissen (1979). Aquest mètode permet la determinació de la concentració de grups α -amino primaris que s'han format durant la hidròlisi proteica, i consisteix en que els grups amino lliures que s'alliberen per cada enllaç peptídic hidrolitzat, reaccionen amb el TNBS en condicions alcalines i formen un complex de color groc, la densitat òptica del qual es pot mesurar espectrofotomètricament.

Les mostres de l'hidrolitzat proteic es dissolien en dodecil sulfat sòdic (SDS, Panreac Química S.A., Montcada i Reixac, Barcelona) a l'1,0 %, a una concentració d'entre 0,25 i $2,5 \times 10^{-3}$ equivalents amino/L. Una alíquota de 0,250 mL de la solució de l'hidrolitzat en SDS a l'1 % es mesclava amb 2,0 mL de tampó sodi fosfat (pH 8,2) en un tub d'assaig i s'afegien 2,0 mL d'àcid trinitrobenzensulfònic (TNBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemanya) al 0,10 %. Els tubs amb la mostra i els reactius s'incubaven a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 60 minuts i a la foscor, perquè la reacció es pot accelerar per l'exposició a la llum. La reacció s'aturava per addició de 4,0 mL d'àcid clorhídric 0,10 N (pH 3,7-3,9), els tubs es refredaven fins a temperatura ambient i es llegia l'absorbància de les mostres a 340 nm en un espectrofotòmetre Shimatzu UV-160A (Shimatzu Corporation, Kyoto, Japó) enfront aigua destil·lada. Per obtenir la recta patró es va utilitzar l'aminoàcid L-Leucina (Merck KGaA, Damstadt, Alemanya).

El grau d'hidròlisi (% GH) es va obtenir a partir dels equivalents amino/g de L-Leucina de les mostres a través de l'equació de la corba patró i es va calcular com la concentració dels grups α -amino formats durant la hidròlisi (en miliequivalents/g de proteïna), és a dir, com el percentatge d'enllaços peptídics hidrolitzats durant la reacció (Olsen, 1985; Petersen *et al.*, 1995), segons l'expressió següent:

$$\text{GH (\%)} = \frac{\text{nombre d'enllaços peptídics trencats}}{\text{nombre total d'enllaços peptídics}} \times 100$$

Es va considerar que el nombre total d'enllaços peptídics presents a la molècula hemoglobina era de 8,38 miliequivalents/g de proteïna (Olsen, 1985). Cada determinació es va dur a terme per duplicat sobre cada mostra.

5.3.5 Percentatge de nitrogen no proteic

Per tenir informació complementària a la determinació del grau d'hidròlisi pel mètode del TNBS, també es va determinar la relació entre el contingut de nitrogen no proteic i el contingut de nitrogen total (% NNP/NT) dels hidrolitzats. Per avaluar el nitrogen no proteic es va procedir a fer precipitar la proteïna de l'hidrolitzat amb àcid tricloracètic (TCA, Panreac Química S.A., Montcada i Reixac, Barcelona) al 25 %. Un cop la proteïna havia precipitat, la solució es filtrava amb un filtre Watman 40 i es determinava el contingut en nitrogen del filtrat (NNP). Els percentatges de NNP i de NT es van determinar pel mètode Kjeldahl (norma ISO R-937). Cada determinació es va fer individualment per duplicat sobre cada mostra.

5.3.6 Experiments preliminars

A continuació s'exposen els diferents experiments preliminars que es van dur a terme amb diversos enzims, a diferents concentracions i condicions de reacció:

- a) **Alcalasa** (a partir d'alguns procediments d'obtenció d'hidrolitzats proteics descrits per Liceaga-Gesualdo i Li-Chan (1999); Olsen (1985) i Synowiecki *et al.* (1996)): Es van realitzar diferents reaccions d'hidròlisi enzimàtica amb Alcalasa 2,4 L en dilucions de FC en aigua destil·lada al 1/2, 1/4 i 1/3. Les concentracions d'Alcalasa assajades van ser 0,4; 0,5 i 1 % (g de la preparació enzimàtica comercial per 100 mL de FC). Les reaccions es van dur a terme a 55°C i a pH 8,5 durant diferents períodes de temps (30, 60, 120, 150 i 180 min).
- b) **Neutrasa** (a partir del treball d'Aubes-Dufau i Combes (1997)): En el cas de la Neutrasa 0,8 L es van dur a terme reaccions d'hidròlisi de solucions de FC diluïdes en aigua destil·lada a la meitat (dilució 1/2). Les concentracions de Neutrasa afegides van ser del 0,5 i de l'1 % (g d'enzim comercial per 100 mL de FC). Les reaccions es van dur a terme a 50°C i a pH 7 durant diferents períodes de temps (30, 60 i 120 min).
- c) **Papaïna**: Es van provar reaccions amb Papaïna de 1,8 unitats/mg a una concentració del 0,5 % (g d'enzim per 100 mL de FC) en solucions de FC en aigua destil·lada (dilució 1/4). Les hidròlisis es van realitzar a 37-40°C i a pH 7,5 durant 60, 90, 120, 180 min i 20 hores.
- d) **Plasmina**: Es va provar d'obtenir hidrolitzats de FC amb l'enzim Plasmina de 3,2 unitats/mg. En aquest cas, es van afegir 0,5 mL d'una dilució prèvia de 1,6 mg de l'enzim en 2,5 mL d'aigua destil·lada en solucions de FC en aigua destil·lada (dilució 1/3). Les hidròlisis es van realitzar a 37-40°C i a pH 7,5 durant 2, 3 i 30 hores.

- e) **Pepsina:** Amb la Pepsina de 452 unitats/mg, les concentracions assajades van ser del 0,34 i de l'1 % (g d'enzim per 100 mL de FC) en dilucions de FC en aigua destil·lada al 1/3 i les hidròlisis es van fer a 37-40°C i a pH 3 durant 1, 2, 3, 4 i 6 hores.
- f) **Tripsina:** Les hidròlisis amb Tripsina (PTN Novo 3.0 P) es van fer sobre solucions de FC en aigua destil·lada (dilució 1/3) a concentracions de l'1 % (g d'enzim per 100 mL de FC), durant 1, 2, 4 i 6 hores a 40-50°C i a pH 7,5.
- g) **Tripsina + Pepsina** (hidròlisi combinada amb Tripsina i Pepsina): Donat que per poder hidrolitzar l'Hb amb Pepsina calia treballar a unes condicions de pH massa àcides (pH 3) que produeixen la desnaturalització de l'Hb i, per tant, un elevat espessiment i/o coagulació de la solució de FC, es va pensar que una hidròlisi combinada dels enzims Tripsina i Pepsina podria donar-nos bons resultats. Per aquest motiu, es van provar processos d'hidròlisi amb la utilització conjunta dels 2 enzims. Aquestes reaccions van consistir en portar a terme, en primer lloc, una hidròlisi amb un 1 % de Tripsina sobre solucions de FC en aigua (dilució 1/3) durant 120 i 180 min, a 40°C i a pH 7,5. Un cop la FC s'havia hidrolitzat amb la Tripsina, es podia acidificar la solució fins a pH 3 sense que es produís augment de la viscositat, s'afegia un 1 % de Pepsina i es duia a terme la hidròlisi pèpsica durant 120 i 180 min, a 40°C i en condicions àcides (pH 3).

Després de cadascuna de les diferents reaccions d'hidròlisi descrites, les solucions d'Hb hidrolitzada es van ajustar a pH 5 o pH 4 i es van centrifugar, tal com s'ha descrit anteriorment. Dels diferents tipus d'hidrolitzats proteics obtinguts es van avaluar: el grau de descoloració, el rendiment en l'obtenció d'hidrolitzat soluble (com el percentatge de sobrenedant respecte al volum de solució d'hidrolitzat total abans de la centrifugació), el grau d'hidròlisi (% GH) i el % NNP/NT assolits en les diferents reaccions.

Per avaluar el grau de descoloració de les mostres de sobrenedants dels hidrolitzats que, després de la centrifugació, eren de color marró transparent, es va determinar l'absorbància a 407 nm (longitud d'ona d'absorció del pigment hemo) amb un espectrofotòmetre Shimadzu UV-160A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japó) enfront aigua destil·lada. Les lectures de l'absorbància es van fer sobre dilucions dels sobrenedants en aigua destil·lada a l'1/100 (en el cas dels hidrolitzats amb Alcalasa i amb Tripsina+Pepsina) o 1/1000 (dels hidrolitzats amb Pepsina).

5.3.7 Aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre l'obtenció d'hidrolitzats proteics de la fracció cel·lular

Com hem vist al Capítol 4, l'alta pressió hidrostàtica produeix certa desnaturalització de la molècula Hb de la FC i, a més, està descrit que els tractaments HHP poden induir l'activació d'alguns enzims. Ambdós factors poden tenir efectes sinèrgics o additius sobre el procés d'hidròlisi enzimàtica de l'Hb i, per tant, afavorir el procés d'obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats de la FC. Els objectius concrets d'aquesta part del treball són investigar si l'aplicació del tractament HHP millora el procés d'obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats mitjançant hidròlisi enzimàtica a partir de la FC tractada amb Tripsina, Tripsina+Pepsina i Alcalasa, els quals eren els enzims que havien donat els millors resultats quant a la capacitat d'obtenir hidrolitzats descolorits als experiments preliminars.

5.3.7.1 Disseny experimental

Es va realitzar un experiment aleatoritzat per blocs complets que va consistir en obtenir 5 mostres diferents de FC (5 repeticions), procedents de mostres de sang de porc recollides en diferents dies però sota les mateixes condicions. A la Figura 5.2 es mostra el procediment experimental que es va dissenyar per avaluar l'efecte de l'aplicació del tractament HHP sobre el procés d'obtenció dels hidrolitzats. A la Taula 5.2 es resumeixen els 6 tipus diferents de tractaments d'hidròlisi assajats i les condicions de reacció aplicades.

Cadascuna de les 5 mostres de FC hemolitzada es va dividir en 6 alíquotes d'uns 200 mL. Tres es van sotmetre al tractament HHP (400 MPa, a 20°C, durant 15 min) abans de l'addició dels enzims proteolítics (HP+E); 2 mostres amb Tripsina i una amb Alcalasa (mostres HP+E 1, 2 i 3, respectivament) i es van dur a terme les reaccions d'hidròlisi corresponents. La mostra HP+E 2, després de la hidròlisi amb Tripsina, es va sotmetre a una hidròlisi amb Pepsina. D'aquests 3 tipus de tractaments d'hidròlisi es van obtenir els hidrolitzats T1, T+P1 i A1.

Les altres tres alíquotes de FC es van sotmetre a les mateixes condicions de pressurització però aquestes ja contenien els enzims (E+HP); dues amb Tripsina i la tercera amb Alcalasa (mostres E+HP 4, 5 i 6). La mostra E+HP 5, després de la hidròlisi amb Tripsina es va sotmetre a una hidròlisi amb Pepsina. A partir d'aquestes 3 mostres, després de les reaccions d'hidròlisi respectives, es van obtenir els hidrolitzats T2, T+P2 i A2. Els tractaments d'alta pressió hidrostàtica es van dur a terme tal com s'ha descrit a l'apartat 4.3.2 del Capítol 4 i les reaccions d'hidròlisi segons els procediments explicats en l'apartat 5.3.6 del present capítol.

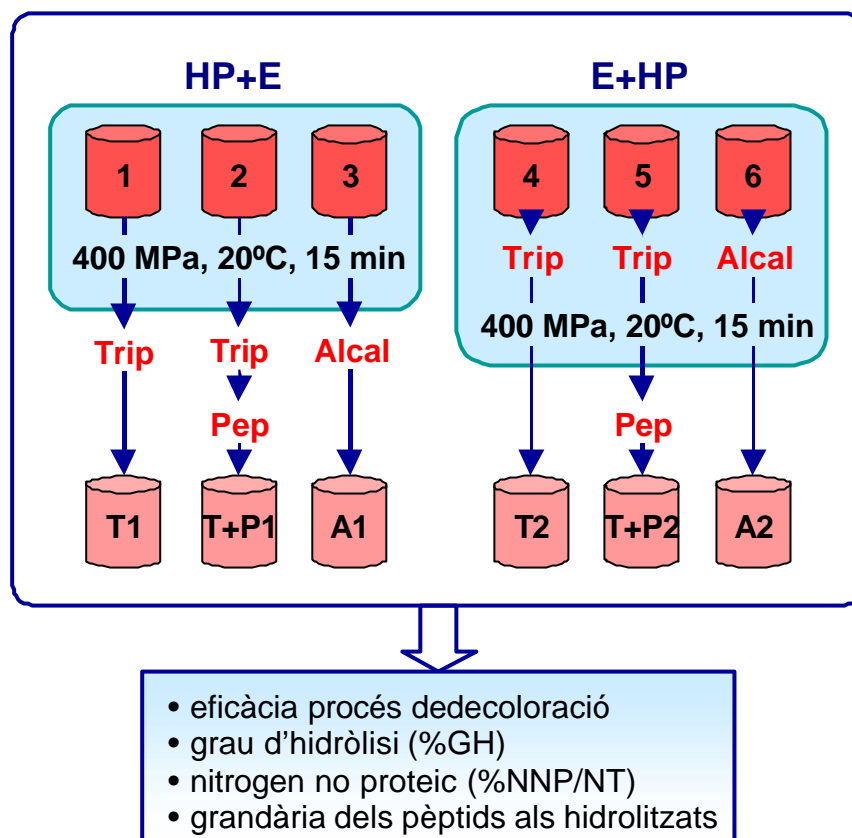


Figura 5.2: Esquema del procediment experimental dut a terme per determinar els efectes de l'aplicació del tractament HHP (400 MPa, 20°C, 15 min) sobre l'obtenció d'hidrolitzats descolorats d'Hb a partir de la FC.

Taula 5.2: Condicions de reacció dels tractaments d'obtenció d'hidrolitzats mitjançant Tripsina (T), Tripsina i Pepsina (T+P) i Alcalasa (A) a partir de FC sotmesa al tractament HHP abans i després de l'addició dels enzims.

Tractament	enzims	hidrolitzat	condicions reacció			
			E/S (%) ^c	T ^a (°C)	pH	t (min)
HP+E 1 ^a	Tripsina	T 1	1	40	7,5	120
HP+E 2 ^a	Tripsina + Pepsina	T+P 1	1+2	37-40	7,5 / 3	120+60
HP+E 3 ^a	Alcalasa	A 1	1	50-55	8,5	120
E+HP 4 ^b	Tripsina	T 2	1	40	7,5	120
E+HP 5 ^b	Tripsina + Pepsina	T+P 2	1+2	37-40	7,5 / 3	120+60
E+HP 6 ^b	Alcalasa	A 2	1	50-55	8,5	120

^a HP+E: FC sotmesa al tractament HHP abans de l'addició dels enzims

^b E+HP: FC sotmesa al tractament HHP després de l'addició dels enzims

^c E/S (%): concentració d'enzim afegida (g de preparació enzimàtica comercial per 100 mL de FC)

5.3.7.2 Caracterització dels hidrolitzats

Per avaluar les característiques dels diferents hidrolitzats es va determinar l'eficàcia del procés de descoloració, el rendiment en l'obtenció de l'hidrolitzat soluble (percentatge de sobrenedant recuperat després de la centrifugació), el grau d'hidròlisi assolit (% GH), el percentatge de nitrogen no proteic (% NNP/NT), i la grandària (PM) i concentració relativa dels pèptids resultants als 6 tipus diferents d'hidrolitzats proteics obtinguts (T1, T+P1, A1, T2, T+P2 i A2). El GH i el NNP es van determinar segons les metodologies descrites als apartats 5.3.4 i 5.3.5, respectivament.

5.3.7.3 Anàlisi dels pèptids obtinguts als hidrolitzats proteics mitjançant electroforesi SDS-PAGE

Per determinar de forma més acurada l'abast de la hidròlisi enzimàtica que havíem assolit als diferents tipus d'hidrolitzats proteics obtinguts a partir de l'Hb, ens interessava estimar la grandària o el pes molecular dels pèptids que composaven els hidrolitzats. Per això, es va dur a terme una caracterització electroforètica dels hidrolitzats mitjançant la tècnica SDS-PAGE (electroforesi en gel de poliacrilamida que es realitza en presència de dodecil sulfat sòdic). Aquesta tècnica consisteix en desnaturalitzar les proteïnes amb SDS i després realitzar una separació electroforètica dels fragments proteics en funció del seu pes molecular en gels de poliacrilamida. En concret, es va utilitzar la tècnica SDS-PAGE en gels d'alta densitat, que permet separar proteïnes de baix pes molecular i pèptids (dins l'interval de 1.000 a 20.000 Da).

Donat que l'Hb té un pes molecular de 68 KDa (uns 17 KDa cada globina), per estimar la grandària aproximada dels pèptids als hidrolitzats proteics es van utilitzar com a patrons uns marcadors de pes molecular d'entre 2.512 i 16.949 Da (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia) obtinguts a partir de globina de cor de cavall. Els marcadors de pes molecular havien estat dissolts en tampó Tris 0,01 M, SDS a l'1 % (p/v), urea 8 M, β -mercaptoetanol a l'1 % (v/v), ajustat a pH 6,8 amb àcid fosfòric, per tenir una concentració de proteïna de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, escalfats a 60°C durant 10 min i, posteriorment, refredats fins a temperatura ambient abans de l'electroforesi.

a) Preparació de les mostres per a l'electroforesi:

Les solucions dels hidrolitzats es van dissoldre en el mateix tampó utilitzat amb els marcadors, descrit a l'apartat anterior, a una concentració de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de proteïna. Prèviament a l'electroforesi, les mostres diluïdes i els marcadors reconstituïts es van escalfar a 100°C durant 5 min, es van refredar i s'hi van afegir 2 gotes de Blau de Bromofenol al 0,01 % com a indicador del front de migració.

b) Condicions de separació electroforètica:

Es van utilitzar gels de poliàcrilamida d'alta densitat PhastGel™ i tires de tampó SDS PhastGel™ (ambdós de Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia). Els gels tenen una zona de compilació de 13 mm (7,5 % T i 2 % C) i una zona de separació contínua de 20 % T i 2 % C; també contenen un 30 % d'etilenglicol i un sistema tampó (acetat 0,112 M, Tris 0,112 M, pH 6,5). Les tires tampó en contacte amb els elèctrodes contenen tricina 0,20 M, Tris 0,20 M i un 0,55 % de SDS (pH 8,1). La separació i el desenvolupament dels gels es va dur a terme en un equip PhastSystem™ (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suècia) que consta d'una unitat de control i un compartiment de separació electroforètica amb un llit de separació amb capacitat per a 2 gels, i una unitat per al desenvolupament dels gels. A cada gel es van carregar uns μL de 3 mostres diferents, de manera que en cada gel s'analitzaven per duplicat dos mostres dels hidrolitzats de FC i un marcador de PM. Les condicions de separació electroforètica foren les següents:

- Pre-electroforesi: voltatge: 500 V; corrent: 10,0 mA; potència: 3,0 W; T^a : 15°C, durada: 1 Vh.
- Aplicació: 500 V; 1,0 mA; 3,0 W; 15°C; 1 Vh.
- Separació: 500 V; 10,0 mA; 3,0 W; 15°C; 158 Vh.

c) Desenvolupament dels gels:

El revelat dels gels es va realitzar mitjançant una tinció amb blau de Coomassie. Els reactius utilitzats van ser: solució de fixació, glutaraldehyd al 2,5 % en aigua destil·lada; solució de tinció blau de Coomassie al 0,1 % (Blau PhastGel R) en etanol al 30 % i àcid acètic al 10 % en aigua destil·lada; solució de rentat o destintat, etanol al 30 % i àcid acètic al 10 % en aigua destil·lada; i solució conservant, glicerol al 10 % i àcid acètic al 10 % en aigua destil·lada. El procés de desenvolupament dels gels de poliàcrilamida d'alta densitat es va fer a 50°C en el mateix equip descrit per a la separació electroforètica i constava de les següents etapes: 4 min per a la fixació, 8 min per a la tinció, 23 min per al destintat, i 5 min per a la conservació.

d) Estimació de la grandària dels pèptids obtinguts en els hidrolitzats d'Hb:

Existeix una relació lineal entre el logaritme del pes molecular ($\log_{10}\text{PM}$) d'un polipèptid desnaturalitzat amb SDS i el seu *Rf*. El *Rf* es calcula com la relació entre la distància migrada per la molècula respecte de la distància de migració de la banda que ha recorregut més distància (o punt de referència), a partir de la següent expressió:

$$Rf = \frac{\text{distància de la banda des de l'origen}}{\text{distància des de l'origen cap al punt de referència}}$$

Per determinar el pes molecular relatiu (*PMr*) es representa una recta patró a partir de la distància de migració respecte el $\log_{10}PM$ dels patrons de pes molecular i, finalment, es calcula el $\log_{10}PMr$ de la mostra després de mesurar la seva distància de migració en el mateix gel.

El pes molecular aproximat dels pèptids en els hidrolitzats es va estimar a partir dels patrons de pes molecular conegut, determinant la distància de migració de les bandes mitjançant el programa d'anàlisi d'imatges 1D Kodak Digital Science™ (Eastman Kodak Company, 1999). Amb el mateix programa es va estimar l'àrea de cadascuna de les bandes (en cm^2) i aquest paràmetre es va utilitzar per quantificar la concentració relativa (%) de cada pèptid dels diferents hidrolitzats, que es va expressar com el percentatge d'àrea de la banda respecte al total de les bandes de cada mostra. La caracterització electroforètica es va fer sobre 4 repeticions d'hidrolitzats i cadascun es va analitzar per duplicat en un mateix gel.

5.3.8 Deshidratació per atomització dels hidrolitzats T+P de la FC

A partir dels resultats dels experiments preliminars i de l'estudi de l'efecte de l'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre l'obtenció d'hidrolitzats proteics mitjançant Alcalasa, Tripsina, i Tripsina seguit de Pepsina, es va escollir aquest últim com el procediment d'hidròlisi que permetia un màxim grau de descoloració de la FC.

Per determinar les millors condicions de deshidratació per atomització dels hidrolitzats descolorats es va dur a terme un experiment amb 6 mostres diferents d'hidrolitzats trípsics i pèpsics d'Hb que s'havien obtingut en dies diferents però sota les mateixes condicions. Els hidrolitzats T+P d'Hb es van obtenir sense l'aplicació del tractament HHP a la FC, de manera que per aconseguir el mateix grau de descoloració i, per tant, el mateix GH (30 %), les hidròlisis es portaven a terme a 40°C , durant 2 h amb un 2 % de Tripsina (a pH 7,5), seguit d'1 h amb un 4 % de Pepsina (a pH 3). En acabar les reaccions, les solucions s'ajustaven a pH 5 abans de la centrifugació.

Els hidrolitzats T+P de FC es van dividir en 4 alíquotes, una es va utilitzar com a control (hidrolitzat líquid) i les altres 3 es van deshidratar per atomització en un equip de laboratori Büchi Mini Spray Dryer B-191 (Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suïssa) a 3 temperatures diferents (170 , 180 i 190°C) i a un cabal d'alimentació constant d'uns $670 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. Les temperatures de sortida de l'aire van oscil·lar entre 75 i 95°C en funció de la temperatura d'entrada. Es van deshidratar amb un cabal d'aire d'aspiració de $60 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ i 5 bar de pressió pel flux d'aire per a la polvorització. El diagrama de flux del procés d'obtenció dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització es mostra a la Figura 5.3. Les mostres d'hidrolitzats T+P d'Hb en pols es van envasar en recipients de plàstic estèrils tancats a temperatura ambient fins que es realitzaven les anàlisis corresponents.

Les millors condicions de deshidratació es van fixar a partir dels resultats obtinguts en la determinació dels efectes de la temperatura d'entrada de l'aire sobre el contingut en humitat, la solubilitat proteica a pH 5 i els paràmetres CIE L*a*b* del color dels hidrolitzats en pols.

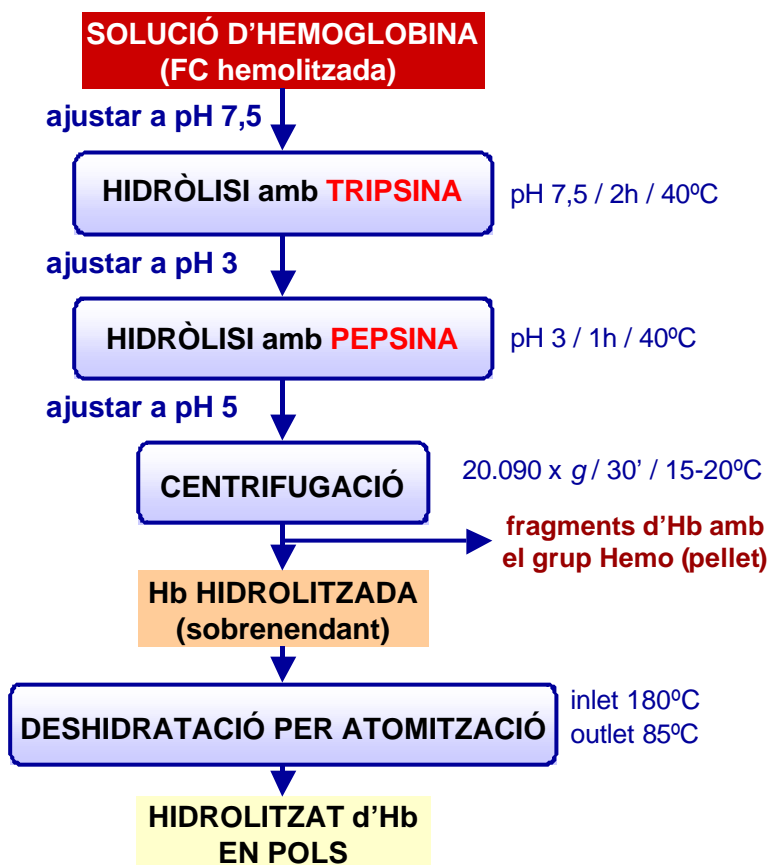


Figura 5.3: Diagrama de flux del procés d'obtenció dels hidrolitzats tripsics i pèpsics d'hemoglobina deshidratats per atomització.

5.3.9 Caracterització físico-química i microbiològica dels hidrolitzats T+P d'hemoglobina

La caracterització físico-química dels hidrolitzats T+P de FC deshidratats per atomització va consistir en determinar els continguts en humitat (norma ISO R-1442), proteïna total pel mètode Kjeldahl (ISO R-937), sals minerals (ISO R-936) i els paràmetres CIE L*a*b* del color dels hidrolitzats en pols, segons els procediments descrits a l'apartat 2.2.6. Totes les determinacions es van dur a terme com a mínim per duplicat sobre 11 mostres diferents d'hidrolitzats T+P d'Hb que s'havien deshidratat per atomització a 180°C tal com s'ha descrit a l'apartat 5.3.8. Per dur a terme la caracterització microbiològica dels hidrolitzats T+P de FC deshidratats per atomització, així com dels hidrolitzats líquids i de la primera matèria de partida, es van determinar els recomptes totals de microorganismes aerobis mesòfils dels 3 tipus de mostres, amb la finalitat de conèixer l'efecte del procés

d'hidròlisi enzimàtica i de la posterior deshidratació per atomització sobre la microbiota contaminat inicial present a la FC. La caracterització microbiològica es va dur a terme sobre les mateixes mostres de la caracterització físico-química. Els recomptes totals es van determinar segons el procediment descrit a l'apartat 2.2.5.1, en medi Base Agar Sang (Oxoid Ltd.). Les plaques s'incubaven en una estufa de cultiu a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 24 hores i posteriorment es realitzava el recompte de les colònies crescudes.

5.3.10 Determinació de les propietats funcionals dels hidrolitzats T+P d'hemoglobina deshidratats per atomització

En primer lloc, es van fer una sèrie de proves preliminars per posar a punt els mètodes de determinació de les propietats funcionals que s'havien utilitzat en la FC pressuritzada i la FC control, per adaptar-les als hidrolitzats d'Hb.

Per provar si els hidrolitzats presentaven capacitat de gelificació o de formació de pastes, unes solucions de l'hidrolitzat en pols al 10 i al 20 % (p/v) en aigua destil·lada es van sotmetre a escalfament a 80°C durant 30 min, es van refredar i es van deixar reposar durant unes 12 hores, però no es va obtenir cap pasta i les solucions van romandre líquides. La hidròlisi produeix una disminució de la hidrofobicitat i un increment de la càrrega neta de les proteïnes dels hidrolitzats que condueix a un increment de les forces de repulsió entre els pèptids. Ambdós factors són responsables de la pèrdua de la capacitat de gelificació dels hidrolitzats i que aquests romanguin solubles després de l'escalfament, sense formar agregats o precipitats (Mahmoud, 1994). Per tant, es va descartar la determinació de la capacitat de formació de pastes o de gels per escalfament als hidrolitzats d'Hb.

La determinació de les propietats funcionals dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització es va dur a terme sobre 5 mostres diferents d'hidrolitzats que s'havien obtingut en diferents dies però sota les mateixes condicions. Les diferents propietats funcionals (solubilitat proteica, activitat emulsionant, capacitat escumant i estabilitat de les emulsions i de les escumes) es van determinar a pH àcid (5), que era el pH de l'hidrolitzat líquid després de la centrifugació, i a pH neutre (7) segons les metodologies descrites a l'apartat 4.3.7 amb algunes modificacions:

- a) **Solubilitat proteica:** es va determinar com el percentatge de proteïna soluble a pH àcid (pH 5) i a pH neutre (pH 7) respecte el percentatge de proteïna total. Les determinacions es van fer en solucions de l'hidrolitzat líquid al 4 % (p/v) i de l'hidrolitzat en pols a l'1 % (p/v).
- b) **Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma:** es van determinar sobre solucions de 200 mL de l'hidrolitzat en pols a l'1 % (p/v) en aigua destil·lada.

- c) **Activitat emulsionant:** es va determinar sobre emulsions preparades amb solucions de l'hidrolitzat en pols en aigua destil·lada en concentracions de 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5 i 2 % (p/v). La determinació de l'absorbància a 500 nm, a t=0 i t=10 min, es va realitzar a partir d'una dilució de 200 µL de l'emulsió obtinguda en 20 mL de SDS al 0,1 % (dilució 1:100).

5.3.11 Tractament estadístic de les dades

Les dades es van analitzar utilitzant el paquet estadístic JMP versió 2.0 (SAS Institute, Inc., 1990). Per avaluar els efectes de l'aplicació del tractament amb altes pressions hidrostàtiques sobre el procés d'obtenció d'hidrolitzats d'Hb (amb Tripsina, Tripsina seguit de Pepsina, i Alcalasa) es va aplicar l'anàlisi de la variància (ANOVA) per investigar si existien diferències significatives entre tractaments sobre el GH i el NNP/NT.

En la determinació de les condicions de deshidratació per atomització dels hidrolitzats T+P d'Hb es van investigar els efectes de la temperatura de deshidratació sobre el % d'humitat, la solubilitat i els paràmetres del color. Pel que fa a la caracterització microbiològica dels hidrolitzats es van avaluar els efectes del tractament (procés d'hidròlisi i deshidratació) sobre els recomptes totals. En el cas de les propietats funcionals, es van avaluar els efectes del tractament (deshidratació) i del pH sobre la solubilitat proteica, els efectes del pH sobre la capacitat escumant i l'estabilitat de l'escuma, i els efectes del pH i la concentració d'hidrolitzat sobre l'activitat emulsionant.

En tots els casos, per a la comparació de mitjanes es va aplicar el test de Tukey-Kramer HDS amb un nivell de significació de $P=95$ %. Les dades que presentaven un valor de $P<0,05$ a partir del test de Barlett es van transformar. En els resultats dels recomptes microbiològics es va utilitzar les dades log-transformades, mentre que en el % de solubilitat, NNP/NT i d'escuma s'aplicava la transformació arcsin $[(\% \text{ paràmetre}/100)^{1/2}]$.

5.4 RESULTATS I DISCUSSIÓ

5.4.1 Experiments preliminars per a l'obtenció d'hidrolitzats a partir de l'Hb

A continuació es resumeixen els resultats de les determinacions del rendiment en l'obtenció d'hidrolitzat soluble, el grau d'hidròlisi assolit, el % NNP/NT i el grau de descoloració aconseguit en els diferents tipus d'hidrolitzats proteics de FC obtinguts als experiments preliminars (Taula 5.3).

Taula 5.3: Percentatge de sobrenedant després de la centrifugació, grau d'hidròlisi, nitrogen no proteic i grau de descoloració als sobrenedants de les solucions d'hidrolitzats d'Hb obtinguts mitjançant diferents enzims proteolítics i condicions d'hidròlisi.

Enzim	condicions reacció				centrifugació		% GH ⁽¹⁾	% NNP ⁽²⁾	color
	E/S ⁽³⁾	T ^a (°C)	pH	t (min)	sobren (%)	pellet (%)			Abs 407 nm
Alcalasa	0,5	55	8,5	60	-	-	25,77	- ⁽⁴⁾	marró fosc
A	0,5	55	8,5	60	91,4	8,6	-	-	
A	0,4	55	8,5	60	82,1	17,9	-	-	
A	0,4	55	8,5	60	86,6	13,4	-	-	
A	0,5	55	8,5	60	89,8	10,2	-	-	1,914
A	0,5	55	8,5	60	82,6	17,4	27,91	55,21	2,021
Alcalasa	0,5	55	8,5	120	-	-	34,16	-	marró fosc
A	0,5	55	8,5	120	83,3	16,7	-	-	translúcid
A	0,4	55	8,5	120	78,8	21,2	-	-	
A	0,4	55	8,5	120	85,4	14,6	-	-	
A	0,5	55	8,5	120	86,8	13,2	-	-	0,182
A	0,5	55	8,5	120	89,4	10,6	35,45	70,35	2,142
A	0,5	55	8,5	120	81,3	18,8	32,95	91,69	0,382
A	0,5	55	8,5	120	82,0	18,0	-	65,91	marró fosc
A	1	55	8,5	120	76,2	18,8	41,59	88,11	0,360
Alcalasa	0,4	55	8,5	150	77,5	22,5	-	-	transparent
A	0,5	55	8,5	180	82,1	17,9	-	-	
Neutrasa	0,5	50	7	30	89,3	10,7	13,46	-	marró fosc
N	1	50	7	30	86,8	13,2	12,61	-	
Neutrasa	0,5	50	7	60	-	-	11,4	-	marró fosc
N	1	50	7	60	87,9	12,1	12,29	-	
Neutrasa	0,5	50	7	120	84,9	15,1	14,08	-	marró fosc
N	1	50	7	120	85,9	14,1	19,51	-	
Papaïna	0,5	37	7,5	60	97	3	-	-	no descoloriment
Pap	0,5	37	7,5	90	96,5	3,5	-	-	(vermell-marró)
Pap	0,5	37	7,5	120	96,6	3,4	-	-	
Pap	0,5	37	7,5	120	91,5	8,5	-	-	
Pap	0,5	37	7,5	180-20h	91,5	8,5	-	-	
Plasmina	0,3	37	7,5	180	100	0	-	-	vermell
Plas	0,3	37	7,5	180	100	0	-	-	vermell
Plas	0,6	40	7,5	30 h	100	0	-	-	vermell

(continua)

Continuació Taula 5.3:

Enzim	E/S ⁽³⁾	T ^a (°C)	pH	t (min)	sobren (%)	pellet (%)	% GH ⁽¹⁾	% NNP ⁽²⁾	color Abs 407 nm
Pepsina	0,34	40	3	60	82	18	6,38	10,38	0,406
P	0,34	40	3	120	84,2	15,8	6,71	8,02	0,399
P	0,34	40	3	180	88,2	11,8	7,79	8,75	0,381
P	1	40	3	120	60	40	18,23	44,79	0,120
P	1	40	3	240	85	15	23,25	48,2	0,199
P	1	40	3	360	37	63	23,17	56,36	0,151
Tripsina	1	50	8	120	97,3	2,7	-	-	no descoloriment
T	1	50	8	240	97,5	2,5	-	-	(vermell fosc)
T	1	50	8	360	98,1	1,9	-	-	
T	1	50	7,5	120	75	25	-	15,75	
T	1	50	7,5	180	70	30	-	23,09	
T	1	50	7,5	120	75,5	24,5	-	34,82	
Trip+Pep	1+1	50-40	8 i 3	2+2h	41	59	23,64		transparent 0,241
T+P	1+1	50-40	8 i 3	2+2h	44	56	28,12	77,8	0,038
T+P	1+1	50-40	8 i 3	3+3h	42,8	57,2	27,52	-	0,213
T+P	1+1	50-40	8 i 3	3+3h	37	63	34,34	89,9	0,070

¹ GH: grau d'hidròlisi (%)

² NNP/NT: nitrogen no proteic respecte nitrogen total (%)

³ E/S (%): concentració d'enzim afegida (g de preparació enzimàtica comercial per 100 mL de FC)

⁴ no determinat

a) **Alcalasa:** de les hidròlisi realitzades a 55°C i a pH 8,5, durant 30, 60, 120 i 180 min, es va observar aclariment de la solució d'Hb (color marró transparent) a partir dels 120 min de reacció, corresponent a un grau d'hidròlisi del 36 % i un % NNP/NT del 79 % aproximadament. Aquestes condicions van permetre recuperar un 83 % de sobrenedant després de la centrifugació. Olsen (1985), per obtenir hidrolitzats de la FC amb d'Alcalasa 0,6 L, proposa un GH del 18-20 %, amb el qual s'aconsegueix una solució de color marró que s'ha d'acabar de purificar. Synowiecki *et al.* (1996), mitjançant la hidròlisi de la FC bovina amb Alcalasa, aconseguen la màxima recuperació de nitrogen a partir de la FC amb un GH del 25 %, malgrat que, si el GH era superior al 19 %, els hidrolitzats eren molt amargants, mentre que Liceaga-Gesualdo i Li-Chan (1999), per obtenir hidrolitzats de proteïnes de peix amb Alcalasa, recomanen un GH del 36 %, que coincideix amb l'assolit en els nostres experiments.

- b) Neutrasa:** en el cas dels assaigs realitzats per hidrolitzar la FC amb Neutrasa, a 50°C i a pH 7 durant 30, 60 i 120 min, el grau d'hidròlisi assolit (13 %) era força inferior als obtinguts amb l'Alcalasa i no es va aconseguir descolorar la solució d'Hb. Aubes-Dufau i Combes (1997) també van observar que la proteòlisi de l'Hb amb Neutrasa era dèbil, i que per obtenir un GH del 12 % es necessitaven 14 h de reacció amb l'addició d'un 12 % d'enzim (E/S).
- c) Papaïna:** en cap dels assaigs realitzats a diferents temps d'hidròlisi (durant 60, 90, 120 i 180 min i 20 hores) a 37°C i a pH 7,5 es va observar descoloració de les solucions d'Hb i aquestes van romandre de color vermell-marró fosc. A més, després de la centrifugació, es va separar molt poca quantitat de pellet i el sobrenedant recuperat (91,5-97 %) es corresponia quasi totalment a la mateixa solució original.
- d) Plasmina:** amb aquest enzim, de les hidròlisis portades a terme a 37°C i a pH 7,5 durant 60, 120, 180 min i 20 hores, tampoc es van observar canvis significatius pel que fa al color de les solucions després de la centrifugació ni es va separar cap fracció insoluble.
- e) Pepsina:** pel que fa a les proves d'hidròlisi de la FC amb Pepsina (a 40°C i a pH 3 durant 2, 4 i 6 h), costava molt arribar a les condicions de pH òptimes d'actuació de l'enzim, donat que s'havia d'acidificar fins a pH 3 i, malgrat que la FC estava diluïda, es produïa un elevat espessiment de la solució. No es va observar descoloriment i els sobrenedants recuperats, entre el 60 i el 86 % de la solució inicial, presentaven un color marró fosc. Tanmateix, els valors del GH (6,4-23,2 %) i del NNP/NT (8,4-52,3 %) eren més moderats que els assolits amb l'Alcalasa i donat que la Pepsina és un enzim amb una major especificitat, les seves possibilitats d'aplicació no es van descartar totalment.
- f) Tripsina:** no es va aconseguir el descoloriment dels sobrenedants en cap de les diferents proves realitzades a 45°C i a pH 7,5-8 durant 2, 4 i 6 h. Es va separar entre un 26 % de fracció insoluble o pellet quan es centrifugava la solució a pH 5, i un 2 % si es centrifugava a pH 8. Per tant, les condicions àcides prèviament a la centrifugació afavorien el procés de separació dels fragments d'Hb soluble del grup hemo. Els hidrolitzats de FC amb Tripsina també presentaven un % NNP/NT més moderat (16-35 %) que els obtinguts amb Alcalasa.
- g) Tripsina + Pepsina:** les hidròlisis que es van dur a terme a uns 40°C i a pH 8, per a la primera etapa del procés amb Tripsina, i a pH 3 per a la segona etapa amb Pepsina, durant 2+2 i 3+3 hores de reacció, conduïen a que només es recuperés entre un 40 i un 43 % de sobrenedant. Aquestes hidròlisis ens van permetre l'obtenció d'hidrolitzats descolorats i, a més, el GH assolit amb aquestes reaccions (25-30 %) era inferior al dels hidrolitzats amb Alcalasa.

A partir dels resultats dels experiments preliminars es van escollir 3 tipus de tractaments d'hidròlisi enzimàtica que presentaven una major eficàcia quant a la capacitat de descoloració de la FC. Aquests van ser les hidròlisis amb Tripsina, el tractament combinat amb Tripsina seguit de Pepsina i la realitzada amb Alcalasa.

5.4.2 Efectes de l'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre l'obtenció d'hidrolitzats proteics de l'Hb

Com s'ha descrit al capítol 4, l'exposició a altes pressions pot produir l'activació o la inactivació dels enzims. L'activitat enzimàtica es veu afectada per la pressió depenent de la intensitat de pressió aplicada, temps i temperatura de pressurització, condicions de pH, concentració de substrat i l'estructura de les subunitats de l'enzim (Hoover *et al.*, 1989; Leadley i Williams, 1997, a; Tewari *et al.*, 2001). Els enzims poden ser inactivats de forma reversible o permanent en funció de la intensitat i la duració de la pressió així com de les condicions del procés associades. La inactivació enzimàtica per la pressió es produeix com a resultat d'una alteració de les estructures intramoleculares o dels canvis conformacionals als llocs actius. Tanmateix, la inactivació d'alguns enzims pressuritzats des de 100 a 300 MPa pot ser reversible. La reactivació després de la descompressió depèn del grau de distorsió de la molècula, malgrat que les possibilitats de reactivació enzimàtica disminueixen en augmentar la pressió per sobre de 300 MPa (Jaenikke, 1981, a; Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). L'alteració del comportament dels enzims (inactivació o activació) després de l'aplicació de la pressió és resultat dels canvis de volum que es produeixen com a conseqüència dels canvis en la conformació proteica.

a) Caracterització dels hidrolitzats

Es aquest apartat es presenten les característiques dels 6 tipus diferents d'hidrolitzats i es comparen amb les dels mateixos tipus d'hidrolitzats obtinguts sense l'aplicació del tractament HHP dels experiments preliminars (hidrolitzats control). El rendiment en l'obtenció d'hidrolitzat soluble després de la centrifugació (sobrenedant), en funció de l'enzim utilitzat i de si el tractament amb alta pressió hidrostàtica s'aplicava a la FC abans o després de l'addició dels enzims proteolítics es mostra a la Figura 5.4.

Les hidròlisis amb Tripsina (T) i Alcalasa (A) permetien una menor separació de fracció insoluble (pellet) que les hidròlisis amb Tripsina seguida d'una hidròlisi amb Pepsina (T+P), a partir de les quals s'aconseguia separar un 45 % de pellet que contenia el grup hemo. Per altra banda, no es van trobar diferències pel que fa a si el tractament HHP s'aplicava a la FC abans (HP+E) i després (E+HP) de l'addició dels enzims sobre el percentatge d'hidrolitzat soluble recuperat, ni tampoc en comparació amb la quantitat d'hidrolitzat obtinguda a partir de FC no sotmesa a alta pressió.

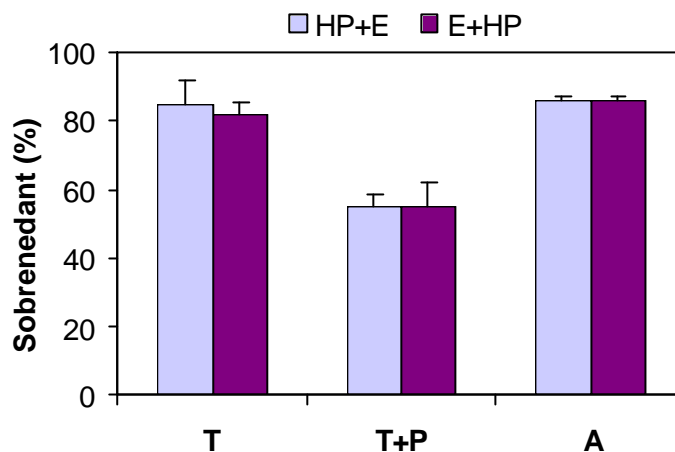


Figura 5.4: Sobrenedant recuperat (%) després de la centrifugació dels hidrolitzats obtinguts mitjançant Tripsina (T), Tripsina i Pepsina (T+P), i Alcalasa (A) a partir de FC sotmesa a altes pressions abans (HP+E) i després (E+HP) de l'addició dels enzims. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$).

A les Figures 5.5 i 5.6 es mostren els resultats obtinguts en les determinacions del grau d'hidròlisi i del percentatge de nitrogen no proteic en els diferents tipus d'hidrolitzats proteics d'Hb obtinguts a partir de mostres de FC que s'havien sotmès al tractament HHP abans i després de l'addició dels enzims proteolítics. També es mostren els resultats de les determinacions dels percentatges de GH i NNP/NT a la FC no hidrolitzada ni pressuritzada.

La intensitat de la hidròlisi enzimàtica assolida (GH i NNP/NT) als hidrolitzats control obtinguts a partir de FC no pressuritzada és força comparable a la dels provinents de FC sotmesa al tractament HHP abans de l'addició dels enzims, però inferior a la que s'obtenia quan l'alta pressió s'aplicava a la FC que ja contenia els enzims. Els hidrolitzats de FC no pressuritzada presentaven un 34 % de GH i un 68 % de NNP, mitjançant Alcalasa; 26,4 % (GH) i 78 % (NNP) amb Tripsina i Pepsina; i 24,5 % de NNP amb Tripsina.

Quant als obtinguts a partir de FC pressuritzada, el grau d'hidròlisi més elevat també es va obtenir mitjançant l'Alcalasa (34 i 35,3 %), seguit de la hidròlisi amb utilització conjunta de Tripsina i Pepsina (24,4 i 29 %), mentre que el GH dels obtinguts amb només Tripsina (19 i 24 %) era inferior. El mateix comportament es va observar en el cas del percentatge de nitrogen no proteic. Es van trobar diferències significatives ($P<0,05$) entre el GH i el NNP/NT dels diferents hidrolitzats. En tots els casos, es va observar que la pressurització de les mostres de FC que ja contenien les proteases (mostres E+HP) conduïa a un increment dels percentatges de GH i de NNP. Tanmateix, l'efecte del tractament HHP sobre els enzims només era significatiu en els cas de les hidròlisis amb Tripsina i la

combinació de Tripsina i Pepsina, però no en els hidrolitzats amb Alcalasa, en els quals no es van trobar diferències entre els valors del GH i del NNP de les mostres de FC pressuritzades abans i després d'afegir l'Alcalasa. Els hidrolitzats T2 (mostres E+HP) tenien un GH significativament superior ($P<0,05$) als T1 (mostres HP+E), mentre que els hidrolitzats T+P2 presentaven un NNP superior ($P<0,05$) als T+P1.

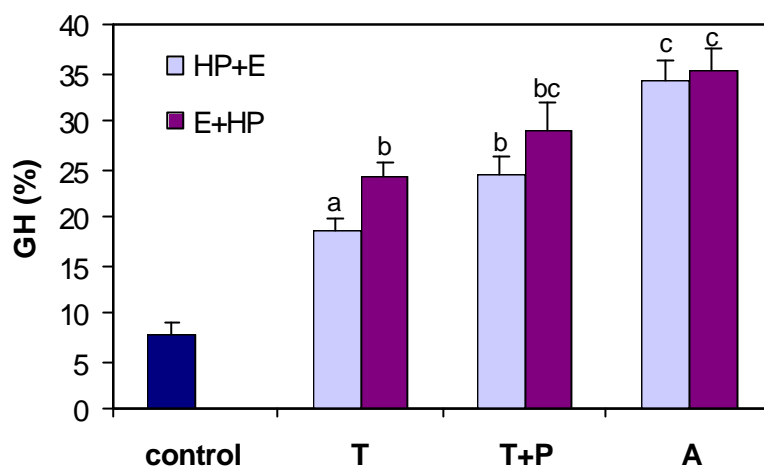


Figura 5.5: Grau d'hidròlisi (%) de la FC no tractada (control) i dels hidrolitzats de FC sotmesa al tractament HHP abans (HP+E) i després (E+HP) de l'addició dels enzims. T: Tripsina, T+P: Tripsina seguit de Pepsina i A: Alcalasa. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents mostren diferències significatives ($P<0,05$) entre els hidrolitzats.

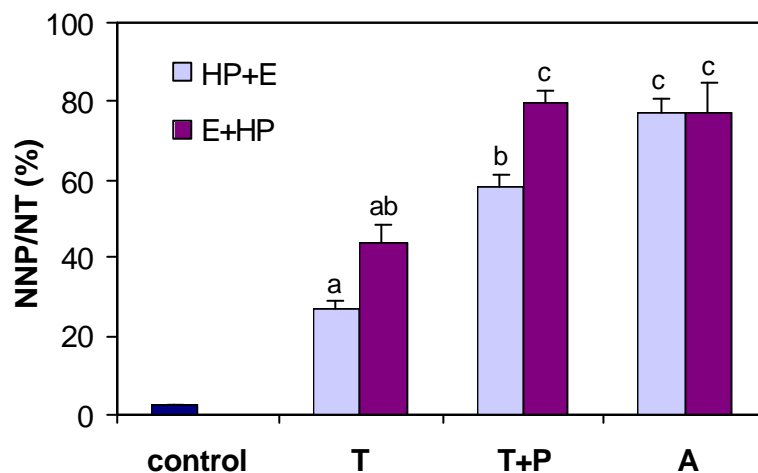


Figura 5.6: Percentatge de NNP de la FC no tractada (control) i dels hidrolitzats de FC sotmesa al tractament HHP abans (HP+E) i després (E+HP) de l'addició dels enzims. T: Tripsina, T+P: Tripsina seguit de Pepsina i A: Alcalasa. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents mostren diferències significatives ($P<0,05$) entre els hidrolitzats.

Els tractaments d'hidròlisi mitjançant la combinació de Tripsina i Pepsina juntament amb l'aplicació de l'alta pressió van permetre l'obtenció d'hidrolitzats d'Hb descolorats. L'hidrolitzat que presentava un major grau de descoloració era l'obtingut mitjançant la pressurització de mostres de FC que contenien Tripsina, sotmeses, posteriorment, a una hidròlisi trípica i pèpsica (fins a un GH del 29 %). En aquests casos, el grau de descoloriment assolit era superior al de les mostres que s'havien tractat per HHP prèviament a l'addició dels enzims (hidrolitzats amb un GH del 24,4 %).

A partir dels resultats de la intensitat d'hidròlisi i del grau de descoloració assolits en els hidrolitzats, en funció de l'enzim utilitzat i de si l'alta pressió hidrostàtica s'aplicava a la FC abans o després de l'addició de les proteases, s'ha observat que és més eficaç aplicar el tractament HHP a la FC que ja contingui la Tripsina que abans d'afegir l'enzim. Per tant, la pressurització potencia l'activitat enzimàtica de la Tripsina sobre l'Hb, com a conseqüència del fet que els efectes conjunts de l'alta pressió sobre la Tripsina en combinació amb la desnaturalització de l'Hb (mostres E+HP) són superiors als efectes del desplegament de l'Hb induït per la pressió (mostres HP+E), perquè els valors de GH i NNP de les mostres pressuritzades abans d'afegir els enzims (HP+E) són molt semblants als dels hidrolitzats control. Segons Tewari *et al.* (2001), l'increment de l'activitat enzimàtica després de la pressurització és conseqüència de que l'alta pressió afavoreix un contacte més estret dels enzims amb els substrats. Els efectes de la pressió sobre les reaccions enzimàtiques poden ser conseqüència dels efectes directes en la reacció, canvis conformationals en l'enzim o la dissociació de les subunitats enzimàtiques (Morild, 1981; a: Balny i Masson, 1993).

L'activitat dels enzims proteolítics en la carn es veu potenciada per l'aplicació d'altres pressions (Homma *et al.*, 1994). Aquests van observar que les activitats totals de les catepsines del múscul, responsables de la tenderització de la carn, i de la fosfatasa àcida, indicadora del trencament de la membrana lisosomal, incrementaven quan es sotmetien a pressions d'entre 1000 i 5000 atm durant 5 min a 2°C perquè la pressió produïa una sortida dels enzims de l'interior dels lisosomes. L'alta pressió pot induir un canvi dràstic en la velocitat de reacció o en l'especificitat d'un enzim i es pot utilitzar per digerir de forma específica una proteïna en un conjunt de proteïnes durant la proteòlisi (Kunugi, 1992, a: Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). El processament HHP també es pot utilitzar per millorar la proteòlisi selectiva de proteïnes. Per exemple, la termolisina digereix preferentment la β -lactoglobulina després d'una pressurització a 2000 atm, mentre que la α -lactalbúmina roman intacta. Aquesta aplicació és molt interessant quan es vol fer una eliminació selectiva de la β -lactoglobulina del sèrum de la llet sense malmetre la α -lactalbúmina, quan els concentrats de lactosèrum es volen utilitzar com a ingredients en llets modificades per a infants per prevenir problemes al·lèrgics (Hayashi *et al.*, 1987, a: Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998). La hidròlisi àcida de les proteïnes millora amb el tractament HHP, mentre que la hidròlisi del midó de blat de moro i de la goma de garrofa no es veu afectada per la pressió (Cheftel, 1992, a: Barbosa-Cánovas *et al.*, 1998).

b) Anàlisi electroforètica dels pèptids que componen els hidrolitzats d'Hb

L'estimació de la distribució de grandària dels pèptids d'un hidrolitzat pot ser útil per mostrar diferències en l'actuació dels diferents tractaments del substrat o enzims utilitzats. Amb aquesta finalitat, s'utilitzen mètodes cromatogràfics o electroforètics. La separació dels pèptids i aminoàcids d'un hidrolitzat proteic mitjançant l'electroforesi SDS-PAGE complementa la informació obtinguda mitjançant la determinació del grau d'hidròlisi i permet conèixer millor la composició del producte (Guadix *et al.*, 2000).

Els patrons electroforètics SDS-PAGE dels diversos hidrolitzats de FC obtinguts amb Tripsina, Tripsina i Pepsina, i Alcalasa, així com de l'Hb no hidrolitzada (FC control) es mostren a la Figura 5.7. A la Taula 5.4 es presenten els pesos moleculars estimats mitjans dels pèptids i la concentració relativa mitjana (%) de cadascuna de les bandes. Els 6 tipus d'hidrolitzats d'Hb mostren diverses bandes de diferent grandària, compreses entre **3.600** i **15.600** Da, dins l'interval de PM dels marcadors de globina utilitzats. Per contra, les mostres d'Hb no hidrolitzada (línia C) presenten una única banda molt intensa, amb un pes molecular mitjà d'uns 15.650 Da, corresponent a les globines.

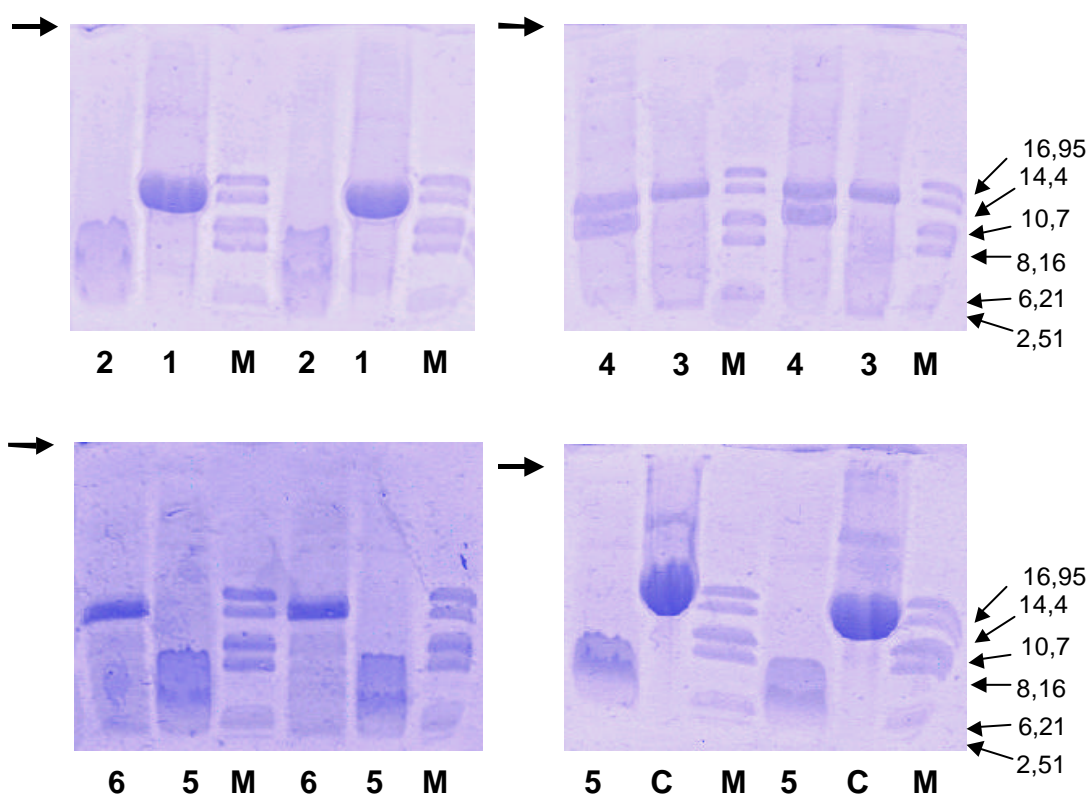


Figura 5.7: Gels SDS-PAGE dels hidrolitzats proteics d'hemoglobina: (M) Marcadors de pes molecular de 2,5 a 16,95 KDa; (C) Hemoglobina no hidrolitzada (FC control); (1, 2 i 3) Hidrolitzats de FC pressuritzada abans de l'addició dels enzims (mostres HP+E), essent (1) hidrolitzats amb Tripsina, (2) amb Tripsina i Pepsina, i (3) amb Alcalasa; (4, 5 i 6) Hidrolitzats de FC pressuritzada amb els enzims (mostres E+HP), essent (4) hidrolitzats amb Tripsina, (5) amb Tripsina i Pepsina, i (6) amb Alcalasa.

Taula 5.4: Pes molecular estimat i percentatge de cada banda (en negreta) dels diferents pèptids que componen els hidrolitzats proteics d'Hb obtinguts mitjançant hidròlisi amb Tripsina (T), Tripsina seguit de Pepsina (T+P) i Alcalasa (A) a partir de FC sotmesa al tractament HHP abans i després de l'addició dels enzims i de la FC no hidrolitzada (control).

<i>Banda</i>	PM estimat dels pèptids (KDa) i percentatge de cada banda (mitjanes ± IC)					
	1	2	3	4	5	6
<i>Interval PM</i>	14,5-17	12,5-14,5	10-12,5	7,5-10	5-7,5	2,5-5
patró PM *	16,95 Globina	14,4 Globina I+II	10,7 Globina I+III	8,16 Globina I	6,21 Globina II	2,51 Globina III
FC control	15,7 ± 0,7 100 ± 0	-	-	-	-	-
HP+T	15,6 ± 0,8 70 ± 13	-	12,1 ± 0,6 30 ± 13	-	-	-
T+HP	15,3 ± 0,9 67 ± 10	-	12,4 ± 1,2 33 ± 10	-	-	-
HP+T+P	-	-	11,3 ± 1,0 49 ± 2	7,3 ± 0,2 51 ± 2	-	-
T+HP+P	-	-	10,2 ± 0,7 47 ± 6	7,5 ± 0,3 53 ± 6	-	-
HP+A	14,9 ± 0,4 31 ± 4	-	10,6 ± 0,5 21 ± 2	8,0 ± 0,3 16 ± 1	7,1 ± 0,2 15 ± 3	3,6 ± 0,1 21 ± 3
A+HP	15,0 ± 0,4 29 ± 6	-	10,8 ± 0,4 22 ± 3	8,3 ± 0,3 16 ± 3	7,4 ± 0,04 17 ± 2	4,3 ± 1,5 21 ± 3

* Globina I+II: pèptid resultant d'un trencament incomplet de fragments de Globina I i Globina II. Globina I+III: pèptid resultant d'un trencament incomplet de fragments de Globina I i Globina III (Pharmacia Biotech AB).

Les concentracions relatives de cada pèptid i els pesos moleculars corresponents dels hidrolitzats obtinguts mitjançant els 6 tipus de reaccions d'hidròlisi són molt similars, independentment de si el tractament HHP s'aplicava abans o després de l'addició dels enzims. Els hidrolitzats amb Tripsina (línies 1 i 4) encara presenten la banda corresponent a la globina, malgrat que el percentatge relatiu ha disminuït una mica respecte de les mostres de FC control. Aquesta és la banda principal (69 %) i té un PM mitjà d'aproximadament **15.400** Da. Als hidrolitzats trípics també s'ha observat una segona banda secundària (31 %) de **12.200** Da.

En segon lloc, els hidrolitzats d'Hb obtinguts amb Tripsina i Pepsina (línies 2 i 5) també presenten 2 bandes, però en aquest cas de menor PM que els anteriors i la fracció

corresponent a la globina ha desaparegut. El pes molecular de la porció principal (52 %) dels hidrolitzats amb T+P és d'uns **7.400 Da**, mentre que la banda secundària (48 %) és d'entre **10.200 i 11.300 Da**.

Per últim, els hidrolitzats amb Alcalasa (línies 3 i 6) mostren 5 bandes diferenciades, amb pesos moleculars de **14.900, 10.700, 8.100, 7.200 i 4.000 Da**, respectivament, essent la primera i la majoritària (30 %) la que es correspondria a la globina, mentre que han aparegut 4 noves bandes: 2 bandes d'intensitat mitjana, de **10.700 (21 %) i 4.000 (21 %)**, i 2 minoritàries, de **8.100 i 4.000 (16 % cadascuna)**.

Els hidrolitzats trípics i els obtinguts amb Alcalasa tenen en comú que encara presenten un cert contingut en globina no hidrolitzada, mentre que l'actuació consecutiva de Tripsina i Pepsina ha hidrolitzat completament la globina. L'absència de globina íntegra en aquests hidrolitzats justifica que el grau de descoloració assolit sigui superior als obtinguts amb Alcalasa, els quals encara contenen al voltant d'un 30 % de globina, i als trípics, en els quals l'Hb s'ha hidrolitzat poc i encara roman aproximadament un 70 % de globina i, per aquest motiu, són els que s'havien descolorat menys.

A partir d'aquest resultat, es va escollir el tractament d'hidròlisi amb Tripsina i Pepsina com a procés més eficaç per obtenir hidrolitzats proteics descolorats a partir de l'Hb. Aquest tractament era el que permetia un major grau de descoloració i, al mateix temps, el grau d'hidròlisi de la molècula era més moderat (25-30 %) i inferior a l'assolit amb l'Alcalasa (34-35 %). En principi, els hidrolitzats trípics i pèpsics d'Hb estan composts fonamentalment per 2 tipus de pèptids, de 10.750 i 7.400 Da. Tanmateix, cal tenir en compte que els diferents hidrolitzats d'Hb obtinguts poden contenir altres fragments proteics de baix pes molecular, que no s'han pogut detectar ni quantificar en l'anàlisi electroforètica si el seu PM és inferior a uns 2,5 KDa. A la Taula 5.5 es poden observar els pesos moleculars i la relació nitrogen amino/nitrogen total dels principals components que formen part dels hidrolitzats proteics.

Taula 5.5: Característiques de les espècies produïdes en la hidròlisi enzimàtica de proteïnes (segons Knights, 1985, a: Guadix *et al.*, 2000).

Espècies	PM (Da)	AN/NT ¹
proteïnes	> 20.000	< 0,01
proteoses	5.000-10.000	< 0,01
peptones	1.000-6.000	0,1-0,5
pèptids	200-500	0,5-0,8
aminoàcids	75-200	0,8-0,9

¹ AN/NT: relació nitrogen amino/nitrogen total.

Els resultats de les determinacions del contingut en nitrogen no proteic en els diferents tipus d'hidrolitzats (Figura 5.6) confirmen aquesta suposició donat que els hidrolitzats trípsics i pèpsics presenten un % NNP/NT que oscil·la entre un 58 %, per a les mostres HP+E (addició de la Tripsina després del tractament HHP), i un 79 % per a les mostres E+HP (quan la Tripsina s'afegia a la FC abans del tractament HHP). Per tant, els hidrolitzats T+P contenen altres fragments de globina, més petits de 2.500 Da (peptones, pèptids i aminoàcids lliures), que no s'han pogut determinar amb l'anàlisi electroforètica.

5.4.3 Deshidratació per atomització dels hidrolitzats T+P de FC

En aquest apartat s'exposen els resultats dels experiments realitzats per estudiar la influència de la temperatura utilitzada per deshidratar els hidrolitzats trípsics i pèpsics descolorats de la FC sobre el contingut en humitat, la solubilitat proteica i els paràmetres del color, per determinar les millors condicions de deshidratació per atomització.

A la Figura 5.8 es mostra el contingut en humitat dels hidrolitzats T+P d'Hb en funció de la temperatura aplicada en la deshidratació. Els hidrolitzats líquids abans de la deshidratació presenten una humitat del $89,02 \pm 0,42$ % i, després de la deshidratació, s'obtenen pols amb continguts en humitat d'entre un $5,1 \pm 0,7$ % (quan la temperatura és de 170°C) fins al $4,8 \pm 0,5$ % (quan es deshidraten a 190°C). Malgrat que el grau de deshidratació en els hidrolitzats en pols és superior en augmentar la temperatura, segons l'ANOVA, no existien diferències significatives ($P > 0,05$) pel que fa a l'efecte de la temperatura de deshidratació sobre el contingut en humitat.

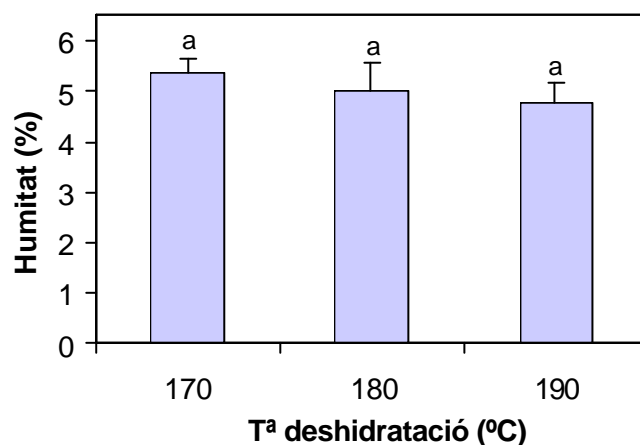


Figura 5.8: Percentatge d'humitat (%) dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització en funció de la temperatura. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Els tractaments amb lletres diferents són diferents significativament ($P < 0,05$).

La influència de la temperatura aplicada en la deshidratació per atomització sobre la solubilitat proteica a pH 5 dels hidrolitzats T+P d'Hb es mostra a la Figura 5.9. Es pot observar que la proteïna dels hidrolitzats d'Hb líquid i en pols presenta una solubilitat a pH àcid molt elevada (99 %). En aquest cas, tampoc es van trobar diferències significatives ($P>0,05$) per l'efecte de la temperatura de deshidratació sobre la solubilitat.

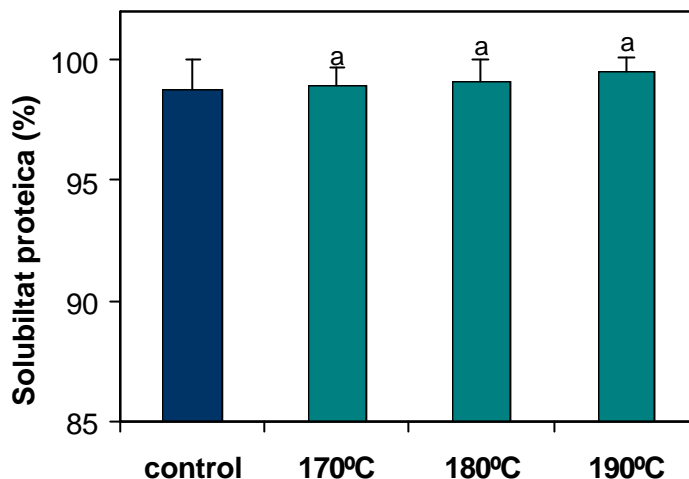


Figura 5.9: Solubilitat proteica (%) a pH 5 de l'hidrolitzat T+P d'Hb líquid (control) i dels hidrolitzats en pols en funció de la temperatura de deshidratació. Les barres d'error indiquen els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents mostren diferències significatives ($P<0,05$) entre les mostres deshidratades.

Els valors dels paràmetres CIE $L^*a^*b^*$ del color dels hidrolitzats T+P d'Hb en pols en funció de la temperatura de deshidratació es mostren a la Taula 5.6. Els paràmetres del color dels 3 tipus de mostres demostren el color blanc característic dels hidrolitzats tròpsics i pèpsics d'Hb en pols. Es va trobar que existien diferències significatives ($P<0,05$) entre els valors de la lluminositat (L^*) per l'efecte de la temperatura de deshidratació. El test de separació de mitjanes va diferenciar dos grups, els hidrolitzats deshidratats a 170°C, que presentaven una major lluminositat, i els de 190°C, els quals eren menys clars o blancs que els anteriors, mentre que els de 180°C no diferien dels altres dos. Per altra banda, no existien diferències significatives ($P>0,05$) pel que fa a l'efecte de la temperatura sobre els valors dels paràmetres a^* i b^* del color dels hidrolitzats en pols.

A partir dels resultats d'aquest assaig, es va escollir 180°C com la temperatura de deshidratació per atomització dels hidrolitzats tròpsics i pèpsics d'Hb. Malgrat que la temperatura utilitzada no tenia efectes significatius sobre el grau de deshidratació i la solubilitat proteica a pH 5 dels hidrolitzats, els que s'havien deshidratat a 190°C eren més foscos que els assecats a 170 o 180°C i, entre aquests dos últims, es va escollir la deshidratació a 180°C perquè ens permetia aconseguir un grau de deshidratació una

mica més elevat i, per tant, una millor conservació del producte durant el període d'emmagatzematge. Tanmateix, tal com hem vist al Capítol 2 en el cas de la FC en pols, seria interessant determinar l'activitat de l'aigua de l'hidrolitzat en pols.

Taula 5.6: Valors dels paràmetres CIE L^* a^* b^* del color dels hidrolitzats trípics i pèpsics d'Hb deshidratats per atomització en funció de la temperatura ⁽¹⁾. Els tractaments amb lletres diferents a la mateixa columna són diferents significativament ($P < 0,05$).

T ^a deshidratació	L* (Lluminositat)	a* (vermell-verd)	b* (groc-blau)
170°C	91,88 ± 0,43 ^a	-0,16 ± 0,08 ^a	7,84 ± 0,83 ^a
180°C	91,57 ± 0,47 ^{ab}	-0,21 ± 0,15 ^a	7,86 ± 0,83 ^a
190°C	90,52 ± 0,72 ^b	-0,27 ± 0,13 ^a	8,26 ± 0,25 ^a

⁽¹⁾ Mitjanes de les determinacions realitzades individualment per triplicat sobre cada mostra (mitjana ± IC; n=6) ($P=95\%$).

5.4.4 Caracterització físico-química i microbiològica dels hidrolitzats T+P de FC deshidratats per atomització

a) Composició química

A la Taula 5.7 es mostren els resultats de les determinacions de la composició química: humitat, proteïna total i sals minerals dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització a 180°C.

Taula 5.7: Composició química dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització a 180°C.

Component	Percentatge (g·100 g ⁻¹ de pols) ^a
HUMITAT	4,76 ± 0,61
PROTEÏNA	84,22 ± 1,44
SALS MINERALS	9,66 ± 0,08

^a Mitjanes de les determinacions fetes com a mínim per duplicat sobre cada mostra (mitjana ± IC; n=11) ($P=95\%$).

D'aquests resultats cal destacar l'elevat contingut en proteïna dels hidrolitzats, fet que permetria la utilització d'aquest producte en productes carnis, salmorres i per augmentar el valor nutritiu dels productes amb cereals, en forma d'ingredient nutricional. També es podria utilitzar per incrementar el valor biològic de la proteïna dels pinsos compostos per alimentació animal, o com a font de nitrogen en aliments especials i altres formulacions alimentàries. El percentatge en sals minerals en els hidrolitzats és força elevat si el comparem amb el 3,03 % de cendres que presenta la FC deshidratada per atomització (Capítol 2). El major contingut en cendres dels hidrolitzats de FC es deu a l'addició d'àcid (HCl) i d'àlcali (NaOH), necessaris per al manteniment del pH de la solució durant el procés d'hidròlisi enzimàtica i per acidificar fins a pH 5 per inactivar els enzims, fet que produeix un augment del contingut en sal (NaCl) al producte final. Liceaga-Gesualdo i Li-Chan (1999) també van observar que els hidrolitzats de proteïnes de peix liofilitzats presentaven un major contingut en cendres (22 %) si el comparaven amb el 14 % de les mostres control. Es va comprovar que els nostres hidrolitzats presentaven un intens gust salat i a la vegada amargant i està previst portar a terme diferents proves per avaluar més acuradament el gust d'aquests.

b) Paràmetres CIE L*a*b* del color

A la Figura 5.10 es pot observar el color blanc característic dels l'hidrolitzats T+P d'Hb descolorats després de la deshidratació per atomització i es pot comparar el seu aspecte amb el de la FC control en pols.



Figura 5.10: Mostres de FC no hidrolitzada (control) (A) i de l'hidrolitzat proteic d'Hb mitjançant Tripsina+Pepsina (B) deshidratats per atomització.

D'altra banda, a la Taula 5.8 es mostren els valors dels paràmetres CIE L*a*b* del color dels dos tipus de productes, a partir dels quals es pot comprovar que els hidrolitzats de FC presenten un elevat valor de L* (Lluminositat o color blanc), una disminució del

paràmetre b^* (o pèrdua de la intensitat del to groc) i, finalment, que el valor del paràmetre a^* (to vermell-verd) és proper al zero, fet que confirma l'absència del pigment hemo en els hidrolitzats i, conseqüentment, la pèrdua del color vermell del producte després de la hidròlisi si es compara amb l'elevat valor de a^* que presenta la FC control.

Taula 5.8: Valors dels paràmetres CIE L^* , a^* i b^* del color de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb deshidratat per atomització. Es mostren els paràmetres del color de la fracció cel·lular no tractada (control) en pols.

Paràmetres del color	Hidrolitzat T+P d'Hb ^a	FC control ^a
L^* (Lluminositat)	91,34 ± 0,35	32,03 ± 0,67
a^* (To vermell-verd)	-0,15 ± 0,11	+21,91 ± 1,47
b^* (To groc-blau)	8,11 ± 0,53	+14,62 ± 1,05

^a Mitjanes de les determinacions fetes com a mínim per triplicat individualment sobre cada mostra (mitjana ± IC, n=11) ($P=95\%$).

c) Caracterització microbiològica

A la Figura 5.11 es mostren els efectes del procés d'hidròlisi enzimàtica i de la posterior deshidratació per atomització sobre els recomptes de microorganismes aerobis mesòfils de la primera matèria de partida, la FC hemolitzada (control).

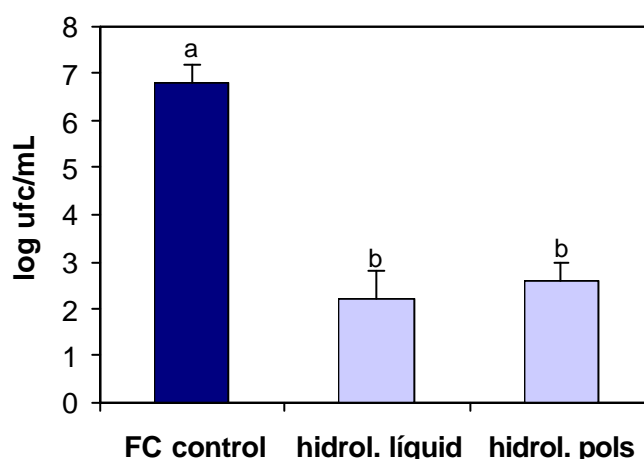


Figura 5.11: Recòmptes totals de la FC hemolitzada (control) i de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb abans i després de la deshidratació. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives entre tractaments ($P<0,05$).

La hidròlisi enzimàtica produeix una disminució significativa ($P < 0,05$) de la microbiota contaminant de la FC. El test de separació de mitjanes va diferenciar clarament 2 grups: la FC control i la FC hidrolitzada (líquida i en pols), de manera que els recomptes totals dels hidrolitzats abans i després de la deshidratació no eren significativament diferents ($P > 0,05$). En el cas de l'hidrolitzat líquid, el grau de reducció de la contaminació inicial és de 4,6 unitats logarítmiques, mentre que en l'hidrolitzat en pols (reconstituït al mateix extracte sec que l'hidrolitzat líquid) és de 4,2 unitats. Aquesta petita diferència pot ser causada pel fet que els recomptes són tan baixos, que la capacitat de reducció d'una unitat logarítmica per part de la deshidratació per atomització quedi emmascarada per la recontaminació que es produeix a causa de la manipulació del producte durant la deshidratació. Tot i així, els recomptes totals dels hidrolitzats són de l'ordre de 10^2 - 10^3 ufc·mL⁻¹, uns recomptes prou baixos com per garantir la qualitat higiènica i sanitària d'aquest producte de cares a la seva possible utilització com a un ingredient nutricional i/o funcional a la indústria alimentària.

També es van determinar els recomptes totals de la microbiota contaminant de mostres d'hidrolitzats T+P obtinguts a partir de FC que prèviament s'havia sotmès al tractament HHP (400 MPa, 20°C, 15 min). En aquest cas, es va observar una reducció de 5 unitats logarítmiques, passant de l'ordre de 10^7 ufc·mL⁻¹ de microorganismes aerobis mesòfils a la FC control fins a 10^2 ufc·mL⁻¹ a l'hidrolitzat líquid obtingut a partir de la FC pressuritzada. Això posa de manifest que l'efecte descontaminant de la hidròlisi, per l'acció combinada dels enzims i l'acidificació, fa innecessari i indetectable l'efecte higienitzador de l'alta pressió.

5.4.5 Propietats funcionals dels hidrolitzats T+P de FC deshidratats per atomització

A continuació s'exposen els resultats de les determinacions de les propietats funcionals (solubilitat proteica, activitat emulsionant, capacitat escumant i estabilitat de l'escuma) dels hidrolitzats T+P de FC deshidratats per atomització.

5.4.5.1 Solubilitat proteica

A la Figura 5.12, on es mostra la solubilitat proteica de l'hidrolitzat T+P d'Hb en estat líquid i del mateix hidrolitzat deshidratat per atomització, en funció del pH, podem observar l'elevada solubilitat dels hidrolitzats a condicions de pH àcid (5) i neutre (7), propera al 100 %. Es va trobar que la deshidratació produïa una disminució significativa ($P < 0,05$) de la solubilitat, fonamentalment a pH neutre (7). Els valors de solubilitat de

l'hidrolitzat en pols eren del 98-99 %, lleugerament inferiors als del producte líquid abans de la deshidratació (100 %), per a les dues condicions de pH estudiades.

Els hidrolitzats T+P de FC presenten una millora de la solubilitat proteica respecte de la FC control. Està descrit que els hidrolitzats proteics sovint presenten una remarcable dispersabilitat en aigua i una elevada solubilitat a un rang molt ampli de pH, les quals són conseqüència de la degradació enzimàtica de la proteïna original a pèptids més petits (Diniz i Martin, 1997) i a un augment del nombre de grups ionitzables (NH_4^+ , COO^-) que determina un increment del caràcter hidrofílic i la càrrega neta que afavoreixen les interaccions entre els aminoàcids hidrofílics i les molècules d'aigua (Mahmoud, 1994; Qi *et al.*, 1997).

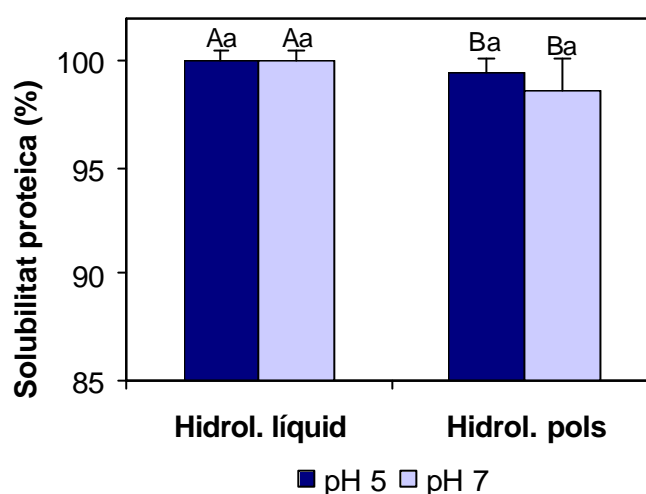


Figura 5.12: Solubilitat proteica a pH 5 i pH 7 de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb en estat líquid i deshidratat. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del tractament (majúscules) i el pH (minúscules).

L'elevada solubilitat dels hidrolitzats proteics al PIE fa que siguin uns ingredients aptes per addicionar-los a aliments líquids o begudes. En l'obtenció d'hidrolitzats proteics a partir de la caseïna mitjançant la Tripsina i la Pepsina, Ziajka *et al.* (1993) també van observar que la solubilitat proteica a pH 4,6 i pH 7 dels 2 tipus d'hidrolitzats incrementava en augmentar el grau d'hidròlisi (% GH), i van proposar la utilització dels hidrolitzats de caseïna en la producció de begudes de fruites amb un major valor nutritiu. Posteriorment, Ziajka *et al.* (1994) van treballar en l'obtenció d'hidrolitzats proteics a partir de proteïnes del sèrum de la llet, van investigar els efectes de diferents condicions d'hidròlisi amb els enzims Tripsina i Pepsina sobre algunes propietats dels hidrolitzats i també van trobar que la solubilitat dels hidrolitzats incrementava degut a l'augment de fraccions de baix pes molecular.

Tanmateix, a diferència del comportament observat en la solubilitat de la FC control en funció del pH, no existien diferències significatives ($P > 0,05$) per a l'efecte del pH sobre la solubilitat dels hidrolitzats d'Hb. Això es deu a que el procés d'hidròlisi, al transformar l'Hb en pèptids de menor pes molecular, ha modificat el PIE dels fragments de globina que componen els hidrolitzats. L'Hb dels vertebrats té un elevat contingut en Histidina (6-10 %) i una estructura altament ordenada. Quan es destrueix la seva estructura, aquests aminoàcids bàsics es desplacen des de l'interior cap a la superfície de la molècula i el PIE incrementa fins a valors de pH propers a 8,2 (Kanko i Autio, 1985). Autio *et al.* (1984) també havien observat que el PIE de la globina (proper a 8) era superior al de l'Hb (7), després de sotmetre la molècula a un tractament tèrmic intens. En canvi, Gómez-Juàrez *et al.* (1999), que van obtenir globina deshidratada per atomització, la qual prèviament havia estat sotmesa a una hidròlisi amb Papaïna seguida d'una descoloració amb una solució d'hipoclorit sòdic (NaClO), exposen que la solubilitat de la globina hidrolitzada era mínima (10 %) a pH 4, intermèdia (75-80 %) a pH 6-8, i màxima (90 %) a pH 12. La disminució de la solubilitat a pH àcid la van atribuir al desplegament de la globina causat per les condicions àcides de la reacció (pH 3).

Per altra banda, l'increment de la càrrega neta com a resultat de la hidròlisi fa que augmenti la repulsió entre els pèptids dels hidrolitzats i, per aquest motiu, no tenen la capacitat de gelificar o de formar pastes per escalfament. Tanmateix, la menor viscositat de les solucions d'hidrolitzats proteics fa que aquests es puguin sotmetre a tractaments tèrmics sense que es produeixi coagulació (Mahmoud, 1994).

5.4.5.2 Capacitat escumant i estabilitat de l'escuma

A les Figures 5.13 i 5.14 es mostren els resultats de les determinacions de la capacitat de formació d'escuma i de l'estabilitat de l'escuma formada a partir de solucions a l'1 % de l'hidrolitzat T+P d'Hb deshidratat per atomització, en funció del pH, i durant un període d'una hora de repòs.

Globalment, l'hidrolitzat d'Hb presentava una capacitat escumant bastant inferior a la de la FC control. Cal considerar que les escumes es van preparar amb una concentració de l'1 % d'hidrolitzat en pols, mentre que les de FC tenien la meitat de concentració (0,5 %), donat que a l'hidrolitzat hi havia més d'un 50 % de NNP. A diferència del comportament escumant de la FC en pols, que presentava una major capacitat escumant al seu PIE (pH neutre), es va observar que el comportament escumant de l'hidrolitzat d'Hb era millor a pH 5 que a pH 7. Tanmateix, no existien diferències significatives ($P > 0,05$) per l'efecte del pH sobre el volum d'escuma obtingut. Aquests resultats coincideixen amb els obtinguts en la determinació de la solubilitat proteica de l'hidrolitzat d'Hb i s'ha de relacionar amb l'increment del PIE dels pèptids de globina respecte el de l'Hb.

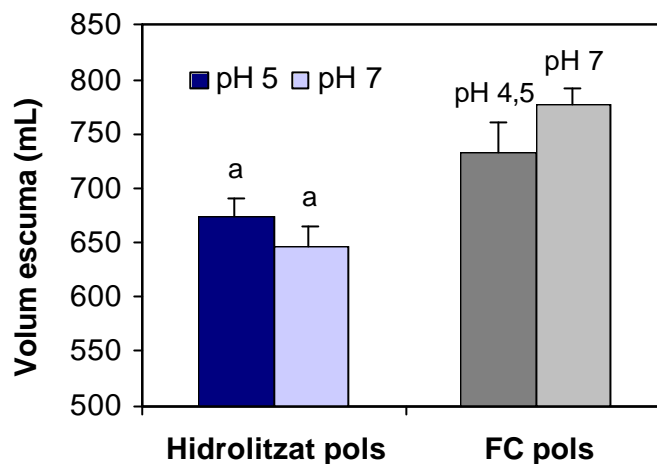


Figura 5.13: Capacitat escumant (mL d'escuma) a pH 5 i 7 de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb en pols (solució a l'1 %). Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del pH. Es mostra la capacitat escumant d'una solució de FC en pols al 0,5 % a pH 4,5 i 7.

Pel que fa a l'evolució del percentatge d'escuma formada a partir dels hidrolitzats d'Hb durant un període d'1 hora de repòs (Figura 5.14), es va observar que les escumes eren molt inestables. La cinètica de disminució del % d'escuma segueix un comportament exponencial a les dues condicions de pH estudiades. Al cap de 10 min de repòs, el percentatge d'escuma retinguda era del 55 i 37 % (a pH 5 i pH 7, respectivament). Aquests percentatges es corresponen aproximadament amb els valors que s'observaven al cap de 2 hores en la FC control en pols a pH 7, mentre que al cap d'1 hora, el % d'escuma havia disminuït fins a un 17 i 13 %. De la mateixa manera que en la capacitat escumant, l'estabilitat de l'escuma obtinguda a pH 7 era inferior que a pH 5. Tanmateix, el pH tampoc tenia efectes significatius ($P>0,05$) sobre l'evolució del percentatge d'escuma que romaní estable durant 1 h de repòs.

Les escumes més estables s'obtenen amb proteïnes globulars d'elevat pes molecular, les quals tenen la capacitat de desplegar-se i adsorbir-se a la interfase aire-aigua, recobrir les bombolles de gas i formar un film proteic gruixut i elàstic que incrementa la viscositat i estabilitza l'escuma (Morr, 1985; Zayas, 1997). Pel que fa als hidrolitzats d'Hb, aquests encara mantenen certa capacitat de formació d'escuma, però han perdut la capacitat de formar una xarxa proteica impermeable estable que retengui l'aire atrapat. La grandària dels pèptids de globina que componen els hidrolitzats té una influència directa sobre les seves propietats de superfície. La reducció del pes molecular dels fragments proteics dels hidrolitzats determina que siguin més flexibles que la molècula nativa i mantinguin certa capacitat escumant però, en canvi, que no tinguin gaire capacitat de polimeritzar per

formar una xarxa proteica, mitjançant interaccions proteïna-proteïna, la qual és necessària per formar escumes estables (Liceaga-Gesualdo i Li-Chan, 1999).

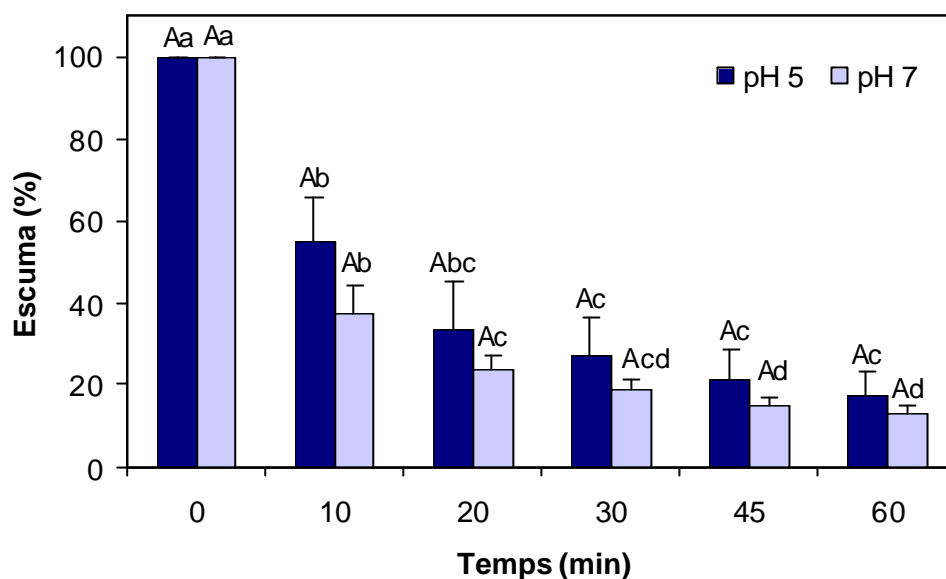


Figura 5.14: Estabilitat de l'escuma (%) a pH 5 i 7 de l'hidrolitzat tríplic i pèptic d'Hb en pols. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del pH (majúscules) i el temps (minúscules) dins de cada pH.

Per altra banda, com hem vist anteriorment, els hidrolitzats d'Hb presenten un elevat contingut de sal. Sembla que la sal (NaCl) exerceix diferents efectes sobre les propietats escumants de les proteïnes. S'ha vist que pot incrementar la capacitat escumant de les proteïnes de soja i de peix a concentracions del 2 %, perquè millora la seva solubilitat. En canvi, a elevades concentracions, pot disminuir l'estabilitat de l'escuma perquè endarrereix el grau crític de desnaturalització necessària per establir les pel·lícules superficials. Phillips *et al.* (1991) van exposar que l'addició de baixes concentracions de sals (0,1 M de tiosulfat sòdic, NaCl i NaSCN) reduïa la capacitat escumant de les proteïnes del lactosèrum perquè els ions interaccionen amb les càrregues superficials de les proteïnes i es redueixen les interaccions electrostàtiques. Per contra, a elevades concentracions (1 M), les sals poden disminuir les repulsions electrostàtiques entre les cadenes polipeptídiques, lliguen l'aigua del sistema i enforteixen les interaccions hidrofòbiques proteïna-proteïna als films.

5.4.5.3 Activitat emulsionant

L'activitat emulsionant dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització, en funció del pH i de la concentració d'hidrolitzat en pols afegida a la fase aquosa de l'emulsió, es mostra a la Figura 5.15. S'han representat els resultats de l'activitat emulsionant

(absorbància a 500 nm) al temps 0 i al cap de 10 min de repòs de les emulsions. Els hidrolitzats d'Hb presentaven unes propietats emulsionants molt pobres si es comparen amb les de la FC control en pols. Tanmateix, amb concentracions baixes d'hidrolitzat (0,1-0,5 %), es va observar que a pH 7 l'activitat emulsionant no era tan dolenta com a pH 5.

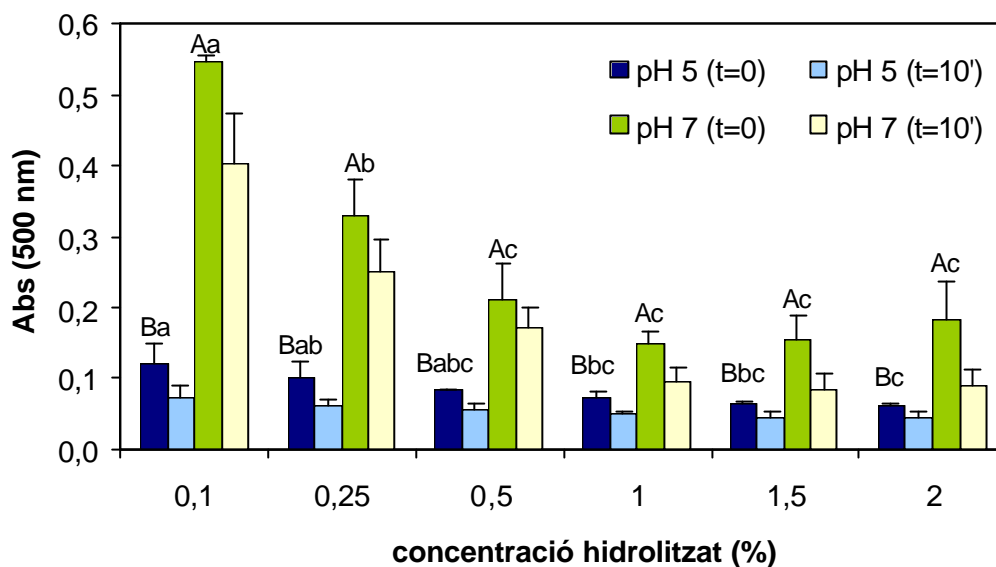


Figura 5.15: Activitat emulsionant a t=0 i t=10 min (absorbància a 500 nm) a pH 5 i 7, de l'hidrolitzat trípsic i pèpsic d'Hb en pols. Les barres d'error mostren els intervals de confiança de les mitjanes ($P=95\%$). Les lletres diferents indiquen diferències significatives ($P<0,05$) per a l'efecte del pH (majúscules) i la concentració (minúscules) a cada pH a t=0.

L'activitat emulsionant als 2 pHs disminuïa en augmentar la concentració d'hidrolitzat afegida a la fase proteica aquosa de l'emulsió, però a pH 5 era molt baixa a totes les concentracions. Es van investigar els efectes de la concentració d'hidrolitzat en pols sobre l'activitat emulsionant a pH 7 i es va trobar que existien diferències significatives ($P<0,05$) per l'efecte de la concentració. El test de separació de mitjanes va separar 3 grups significativament diferents: 0,1 %, 0,25 % i 0,5 %. A partir d'un 0,5 % d'hidrolitzat en pols, l'activitat emulsionant a pH 7 no millorava en augmentar la concentració.

Nakamura *et al.* (1984) van comparar les propietats emulsionants de la globina de sang bovina descolorada amb CMC amb les d'altres proteïnes (albúmina sèrica bovina, hemoglobina i ovoalbúmina). L'activitat emulsionant de la globina disminuïa molt al PIE (pH 7), tal com s'ha exposat al capítol 4, i van estudiar si una modificació química mitjançant acetilació o bé una digestió limitada amb Pepsina, milloraven les propietats emulsionants d'aquesta globina. Els hidrolitzats pèpsics de globina presentaven una porció principal amb un pes molecular d'entre 3500 i 6000 Da i, malgrat que a pH 7 eren totalment solubles, la seva activitat emulsionant i l'estabilitat de l'emulsió eren molt baixes. Aquests resultats coincideixen amb el comportament dels nostres hidrolitzats

trípsics i pèpsics. Finalment, aquests autors van trobar que l'addició de CMC als hidrolitzats pèpsics de globina millorava tant l'activitat emulsionant com l'estabilitat de l'emulsió i ho van atribuir a algun efecte sinèrgic de la CMC sobre els pèptids de l'hidrolitzat.

Està descrit que els efectes de la hidròlisi enzimàtica sobre les propietats emulsionants pot variar en funció del tipus de proteïna i del grau d'hidròlisi. Les propietats emulsionants de les proteïnes del sèrum de la llet no canvien amb una hidròlisi suau però disminueixen considerablement a mida que avança la proteòlisi (Kueler i Stine, 1974; a: Nakamura *et al.*, 1984). En incrementar el GH, també s'ha observat que les propietats emulsionants de la caseïna i de les proteïnes de soja disminueixen (Calderón de la Barca *et al.*, 2000), que es pot atribuir a una disminució de la hidrofobicitat superficial respecte de les mostres no hidrolitzades.

En canvi, altres autors han trobat que les propietats emulsionants de les proteïnes de soja es poden millorar amb un tractament enzimàtic. Qi *et al.* (1997) van determinar els efectes d'una hidròlisi limitada amb Pancreatina (composada principalment per Tripsina i Quimotripsina), a pH 7,5 i a 37°C, sobre algunes propietats funcionals dels hidrolitzats proteics de soja, i van investigar la influència del grau d'hidròlisi amb la solubilitat, el pes molecular de les proteïnes, la hidrofobicitat superficial i les propietats emulsionants dels hidrolitzats. Van observar que l'activitat emulsionant dels hidrolitzats de soja incrementava en augmentar el GH (fins a un 15 %) i ho van atribuir a un increment en el nombre de grups hidrofòbics disponibles, els quals milloraven les interaccions entre les proteïnes i els lípids. Al mateix temps, però, un major GH feia disminuir l'estabilitat de l'emulsió perquè els pèptids més petits tenien menor capacitat de formar una pel·lícula contínua i viscosa en la zona interfasial que la proteïna nativa.

Mahmoud (1994) explica que una hidròlisi limitada produeix una alteració de l'estructura molecular que fa que les zones hidrofòbiques de l'interior quedin més exposades a l'ambient aquós, i això millora les propietats emulsionants, sempre i quan existeixi un equilibri entre els grups hidrofòbics, que interaccionen amb l'oli, i els hidrofílics, amb la fase aquosa. Per contra, una hidròlisi extensiva produeix una disminució dràstica de les propietats emulsionants, segurament causada per la menor longitud de la cadena peptídica. Sembla que existeix un pes molecular òptim (més de 20 residus) perquè els pèptids tinguin un bon comportament emulsionant.

En el cas dels hidrolitzats T+P d'Hb, el tractament enzimàtic ha pogut modificar les característiques amfifíliques de l'Hb, de manera que els pèptids dels hidrolitzats han perdut les propietats de disminució de la tensió interfasial que tenia la proteïna original. Els pèptids obtinguts a partir de la FC poden tenir un balanç hidròfil-hidròfob diferent al de l'Hb i, per tant, són menys amfifílics. Aquest fet, juntament amb la menor longitud de cadena dels fragments de globina, repercuteixen adversament en les seves propietats

escumants i emulsionants. Per tant, el procés d'hidròlisi de l'Hb mitjançant Tripsina i Pepsina que s'ha proposat permet la obtenció d'un producte en pols descolorat amb un elevat contingut en proteïna i una solubilitat molt elevada, però el grau d'hidròlisi necessari per assolir aquest descoloriment (30 %) ha estat excessiu i ha afectat molt negativament les propietats de superfície que tenia l'Hb de la FC.

Tanmateix, existeixen alguns sistemes per millorar les propietats funcionals dels hidrolitzats proteics, basats en modificacions de l'estructura molecular i de la funcionalitat de les proteïnes dels hidrolitzats mitjançant enzims específics. Es pot utilitzar l'enzim Transglutaminasa per formar enllaços creuats intermoleculars i modificar les propietats reològiques i d'activitat de superfície (Kinsella i Whitehead, 1989, a: Dickinson i McClements, 1996) i per convertir una emulsió líquida estabilitzada per una proteïna en un gel emulsionat viscoelàstic (Matsumura *et al.*, 1993, a: Dickinson i McClements, 1996); o mitjançant la reacció de la plasteïna, que permet resintetitzar de forma artificial un nou oligopèptid o proteïna de pes molecular elevat, a partir dels fragments proteics de pes molecular baix que componen un hidrolitzat, incorporant aminoàcids en la forma éster (Pomeranz, 1991).

Una altra alternativa seria sotmetre els hidrolitzats a un procés de concentració mitjançant ultrafiltració, per eliminar els pèptids més petits i els aminoàcids lliures, així com les sals, a fi i efecte de recuperar un concentrat de fragments de globina de pes molecular intermedi, el qual pot tenir una funcionalitat molt diferent al producte que hem obtingut després de la hidròlisi. En les determinacions de les propietats escumants i emulsionants, amb les concentracions d'hidrolitzat en pols assajades, hem sobrevalorat el contingut en proteïna total, del qual només aproximadament un 20 % és proteïna i la resta es correspon a nitrogen no proteic. La ultrafiltració permetria la separació de les molècules de baix pes molecular i l'obtenció d'un retentat, o concentrat de fragments proteics de longitud de cadena intermèdia, que podrien tenir unes millors propietats de superfície, les quals no s'han posat de manifest al nostre estudi.

5.5 CONCLUSIONS

Dels diferents enzims assajats, només l'Alcalasa, la Tripsina i la Pepsina mostren capacitat per descolorar l'Hb, tot i que cap dels 3 és capaç de produir una descoloració suficient. L'acció combinada de la Tripsina a pH 7,5 seguida de la Pepsina a pH 3 és el tractament enzimàtic que presenta una major eficàcia.

El tractament amb altes pressions hidrostàtiques incrementa l'activitat de la Tripsina sobre l'Hb quan el substrat i l'enzim es tracten conjuntament i afavoreix el procés d'obtenció d'hidrolitzats descolorats a partir de la FC, la qual cosa, permet assolir el

mateix grau de descoloració amb una dosi d'enzim inferior. El tractament d'hidròlisi de la FC amb la utilització combinada de Tripsina seguida d'un tractament amb Pepsina permet l'obtenció d'un hidrolitzat proteic d'Hb descolorat i hidrolitza completament la globina, donant lloc a 2 pèptids majoritaris, de 10,8 i 7,4 KDa. Val a dir que també produeix un 60-80 % de nitrogen soluble en TCA, constituït fonamentalment per pèptids petits i aminoàcids lliures.

Les millors condicions per deshidratar per atomització els hidrolitzats tripsics i pèpsics d'Hb, obtinguts a partir de FC no pressuritzada, són 180°C a 600 mL·h⁻¹, a partir de les quals s'obté un producte en pols de color blanc (L*: 91,3; a*: -0,15 i b*: 8,1), amb una humitat del 4,7 %, un 84,2 % de proteïna i un 9,7 % de sals minerals. Addicionalment, el procés d'hidròlisi enzimàtica permet una reducció considerable de la microbiota contaminant de la FC, obtenint un producte en pols amb uns recomptes totals de l'ordre de 10²-10³ ufc·g⁻¹.

Pel que fa a la funcionalitat dels hidrolitzats d'Hb deshidratats per atomització, aquests presenten una elevada solubilitat proteica a pH 5 i a pH 7 i romanen solubles després d'un escalfament a 80°C durant 30 min. Tanmateix, malgrat que encara mantenen certa capacitat escumant, el procés d'hidròlisi ha afectat molt negativament la capacitat de mantenir estable l'escuma obtinguda i l'activitat emulsionant.

Perspectives de futur

a) Possible activitat antioxidant dels hidrolitzats

Existeixen alguns estudis centrats en la utilització d'hidrolitzats proteics com a substàncies antioxidants. Algunes fraccions de baix pes molecular dels hidrolitzats poden ser una font potencial d'antioxidants d'origen natural. Peña-Ramos (2001) descriu un procediment per separar i aïllar pèptids amb activitat antioxidant a partir d'hidrolitzats del sèrum de la llet.

b) Eliminació del gust amargant del hidrolitzats proteics

La qualitat dels hidrolitzats proteics de la FC es veu compromesa perquè aquests presenten un gust amarg. Aquest estudi forma part d'un projecte conjunt amb l'Institut de Recerca en Tecnologia Alimentària (IRTA), on s'han de portar a terme les proves d'addició dels hidrolitzats d'Hb en productes carnis model i l'avaluació sensorial del producte que contingui els hidrolitzats mitjançant un panel de catadors.

La formació de pèptids amargants durant la hidròlisi enzimàtica es produeix com a conseqüència de la proteòlisi i no és resultat de reaccions paral·leles indesitjables (Aubes-Dufau i Combes, 1997). Els pèptids que contenen aminoàcids hidrofòbics com

leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina i triptòfan, són els responsables de conferir gust amarg (Pedersen, 1994). A les proteïnes no hidrolitzades, les regions hidrofòbiques de les cadenes polipeptídiques solen estar situades a l'interior de les molècules, de manera que no afecten als sensors del gust. Per tant, el desenvolupament del gust amarg depèn del grau d'hidròlisi i també de la composició en aminoàcids de les proteïnes. Pedersen (1994) va fer una revisió de diferents estratègies que es poden utilitzar per reduir o eliminar el gust amargant dels hidrolitzats proteics. Aquests mètodes inclouen: (1) una separació selectiva, (2) l'emascament, i (3) un tractament enzimàtic.

La separació selectiva dels agents responsables del gust amarg es pot fer amb carbó actiu, que actua com a un adsorbent hidrofòbic i lliga els pèptids i aminoàcids hidrofòbics, però aquest tractament comporta una pèrdua del contingut en nitrogen proteic; altres adsorbents hidrofòbics per eliminar el gust amargant dels hidrolitzats són la cromatografia d'interacció hidrofòbica en hexilsefarosa, hexilepoxi cel·lulosa i resina de formaldehid fenòlic; i l'extracció selectiva dels pèptids amargs amb una barreja de butanol i aigua o amb una solució d'etanol, entre d'altres.

També es pot emascarar o disminuir el gust amarg per addició de polifosfats durant el procés d'hidròlisi o per addició de gelatina, glicina, ciclodextrines, i mesclar els pèptids amargs amb proteïnes com un concentrat de proteïnes del lactosèrum, llet desnatada i soja, o l'addició d'àcid glutàmic, àcid aspàrtic o taurina en solució àcida, perquè el gust amarg disminueix quan el compost amargant es barreja amb un àcid.

Finalment, es poden aplicar tractaments enzimàtics amb exopeptidases, com per exemple la reacció de la plasteïna (Synowiecki *et al.*, 1996), carboxipeptidases que degraden els pèptids amargants, o l'enzim Flavourzyme[®], un complex enzimàtic d'exopeptidases i endoproteases d'origen fúngic que es pot utilitzar per degradar els pèptids amargants i obtenir un hidrolitzat amb un elevat grau d'hidròlisi (50 %) però sense gust amarg (Novozymes, Novo A/S). El principal inconvenient d'aquests tractaments enzimàtics són que els hidrolitzats consisteixen majoritàriament en aminoàcids lliures i pèptids molt petits.

c) Aprofitament del grup hemo

Com hem vist en aquest capítol, després del procés d'hidròlisi enzimàtica, la solució de FC hidrolitzada es centrifuga per separar la fracció soluble (hidrolitzat proteic) del pellet (residu insoluble que conté el grup hemo encara lligat a fragments proteics de la globina), el qual encara roman pendent de caracteritzar.

Aquest pellet és directament aprofitable com a font de ferro hemínic i restes de proteïnes i aminoàcids, o bé es podria separar i recuperar el grup hemo que conté, a partir del qual, es pot obtenir ferro per utilitzar-lo amb finalitats nutricionals i/o farmacèutiques. Una altra

possibilitat és sotmetre'l a una hidròlisi exhaustiva fins a nivells d'aminoàcids lliures, per utilitzar-lo com a ingredient nutricional per a alimentació animal o en adobs per plantes, tenint en compte que l'absència de pèptids de pes molecular inferior a 10 KDa és una garantia de l'absència de prions.

Conclusions

A continuació es presenta un recull de les conclusions que ja han estat exposades al final de cada capítol d'aquest treball:

1. La ultrasonicació permet produir l'hemòlisi dels eritròcits de la FC de la sang de porc amb la finalitat d'alliberar l'Hb del seu interior abans de la deshidratació per atomització. Les condicions considerades com a òptimes són tres períodes de 2 minuts a 75 W amb 1 minut de descans entre tractaments.
2. La millor temperatura de deshidratació per atomització de la FC hemolitzada és 140°C, tenint en compte el màxim grau d'assecament de la mostra sense que es produeixi una disminució important de la solubilitat de la proteïna. La FC hemolitzada i deshidratada per atomització presenta un contingut en humitat del 5,3 % i un percentatge de solubilitat proteica del 96 %. El procés tecnològic de deshidratació per atomització produeix modificacions dels paràmetres calorimètrics de la FC, fet que indica que la deshidratació indueix canvis en l'estructura nativa de l'Hb i, per tant, cert grau de desnaturalització proteica que pot conduir a una disminució de les seves propietats funcionals.
3. La càrrega contaminant de la FC fresca de la sang de porc és força elevada i el tractament amb ultrasons utilitzat per hemolitzar-la i la centrifugació posterior no produeixen una reducció significativa de la microbiota contaminant, obtenint un producte amb uns recomptes microbiològics de l'ordre de 10^6 ufc·mL⁻¹. La deshidratació per atomització produeix una disminució d'una unitat logarítmica dels recomptes totals de la FC hemolitzada. Malgrat tot, el producte deshidratat encara reflecteix l'elevada contaminació de la primera matèria i és susceptible de presentar *S. aureus* i formes esporulades de clostridis sulfít-reductors, fet que condiciona negativament la seva utilització com a ingredient per a la indústria alimentària, a no ser que es millorin les condicions de recollida de la sang a l'escorxador o que aquesta o la FC es sotmeti a algun tractament d'higienització prèviament a la deshidratació.
4. L'extracte sec de la FC hemolitzada i deshidratada per atomització a 140°C està compost per un 94,6 % de proteïna, un 3 % de sals minerals i un 0,7 % de greix. Els valors de les coordenades de color CIE L*a*b* de la FC en pols són força constants i reflecteixen el color vermell marronós fosc d'aquesta, degut fonamentalment a que durant la deshidratació es produeix una oxidació del ferro hèmic de l'Hb.
5. Les isoterms de sorció a 20°C de la FC deshidratada per atomització tenen una forma sigmoïdal i presenten una histèresi estreta i llarga. L'equació GAB és un bon

model matemàtic per ajustar les dades de sorció obtingudes experimentalment i determinar la isoterma d'adsorció de la FC deshidratada per atomització, per conèixer la relació funcional entre el contingut en humitat i l'activitat de l'aigua del producte en pols. El percentatge d'humitat de la FC deshidratada a 140°C es correspon, segons la isoterma d'adsorció obtinguda pel model GAB, a un valor d' a_w a 20 °C d'aproximadament el 0,165. Tenint en compte que ens troben per sota dels valors d' a_w corresponents a la capa monomolecular, podem garantir la conservació a temperatura ambient del producte, sempre i quan aquest s'envasi en recipients tancats que no permetin l'entrada d'humitat de l'exterior.

6. De l'estudi del possible efecte estabilitzant del color de la FC deshidratada per atomització mitjançant l'addició d'additius amb activitat potencialment reductora i/o segrestant del ferro hemínic, s'ha observat que només l'addició d'àcid ascòrbic o glucosa i l'àcid nicotínic i la nicotinamida té efectes positius sobre el color del producte en pols.
7. En tots els assaigs realitzats s'observen canvis de color en la FC, provocats pel tractament de deshidratació, que són característics de l'oxidació de l'Hb. A més, durant els 2 mesos d'emmagatzematge, el color segueix evolucionant i s'aprecia un augment progressiu de l'enfosquiment i la tonalitat marronosa.
8. L'àcid ascòrbic i la glucosa no milloren la conservació del color de l'Hb, modifiquen els paràmetres a^* i b^* , però disminueixen l'enfosquiment que es produeix durant la deshidratació per atomització, amb la qual cosa es pot obtenir un producte en pols de color marró més clar que sense l'addició d'aquests antioxidants. Al final del període d'emmagatzematge, les mostres additivades amb un 2 % d'ascòrbic o un 1-2 % de glucosa són més clares que la FC control.
9. L'addició de dextrina o L-cisteïna no disminueix l'enfosquiment que es produeix durant la deshidratació de la FC ni evita el canvi de color de l'Hb. L'efecte de les diferents concentracions de dextrina no produeix variacions significatives en cap dels 3 paràmetres del color de la FC en pols, donat que aquests disminueixen durant el temps d'emmagatzematge, sense que existeixi una relació entre les diferents concentracions de dextrina. D'altra banda, la cisteïna, no només no protegeix a la FC de l'enfosquiment, sinó que produeix una disminució de les tonalitats vermella i groga de la pols, que és proporcional a la concentració de cisteïna.
10. L'àcid nicotínic i la nicotinamida protegeixen el color de l'Hb durant el procés de deshidratació i el període d'emmagatzematge de la FC en pols. L'addició d'un 2 % d'àcid nicotínic a la FC evita considerablement l'enfosquiment produït per la deshidratació i l'emmagatzematge posterior i permet l'obtenció d'una pols de FC més clara, més vermella i més groga que la FC control. Per altra banda, es va trobar que

la FC additivada amb un 2,5 % de nicotinamida, també era menys susceptible a l'enfosquiment o canvi de color produït tant durant la deshidratació com durant el període d'emmagatzematge.

11. De les diferents condicions d'aplicació del tractament HHP sobre la FC assajades, es considera que les millors són 400 MPa a 20°C de temperatura durant 15 minuts perquè produeixen una millora significativa de la qualitat microbiològica. L'aplicació de l'alta pressió hidrostàtica permet una reducció de la microbiota contaminant de la FC d'entre 2 i 3 unitats logarítmiques. Per tant, aquest tractament és una tecnologia eficaç per higienitzar la FC de la sang de porc i millorar la seva qualitat microbiològica. Aquestes condicions de tractament no afecten negativament al color, no comprometen gaire la solubilitat proteica de l'Hb i, malgrat que produeixen un augment de la viscositat, la FC roman fluida després del tractament.
12. L'aplicació del processament per HHP i la posterior deshidratació per atomització permeten obtenir un producte en pols amb recomptes totals de l'ordre de 2,8 unitats logarítmiques.
13. El color de la FC pressuritzada en pols és igual que el de la FC control deshidratada, com a conseqüència del fet que ambdues mostres són igual de susceptibles a l'oxidació del grup hemo produïda per la deshidratació.
14. Pel que fa als efectes del tractament HHP sobre les propietats funcionals de l'Hb de la FC deshidratada per atomització, l'alta pressió incrementa la susceptibilitat de l'Hb als efectes desnaturalitzants de la deshidratació, fonamentalment a pH 7 (PIE), ja que s'ha observat una disminució de la solubilitat proteica a pH neutre de la FC després dels 2 processos tecnològics.
15. La FC en pols presenta una màxima capacitat escumant al PIE de l'Hb. L'aplicació del tractament HHP produeix una disminució de la capacitat escumant de la FC, però no té efectes negatius sobre l'estabilitat de l'escuma fïmada. D'altra banda, el tractament HHP tampoc té efectes negatius sobre l'activitat emulsionant de l'Hb. La màxima activitat emulsionant de l'Hb s'aconsegueix amb una concentració de FC en pols de l'1,5 % a pH 7 i de l'1 % a pH 4,5.
16. Les pastes obtingudes per escalfament de la FC presenten característiques molt diferenciades depenent del pH. A pH neutre es formen unes pastes dures i consistents, mentre que a pH àcid les pastes són poc consistents, molt adhesives i més elàstiques que les anteriors. Aquestes tenen, a més, una capacitat de retenció d'aigua molt superior que les de pH 7, en les quals l'aigua queda retinguda per capil·laritat. La textura i capacitat de retenció d'aigua de les pastes tampoc es veuen afectades pel tractament d'alta pressió.

17. Dels diferents enzims assajats, només l'Alcalasa, la Tripsina i la Pepsina mostren capacitat per descolorar l'Hb, tot i que cap dels 3 és capaç de produir una descoloració suficient. L'acció combinada de la Tripsina a pH 7,5 seguida de la Pepsina a pH 3 és el tractament enzimàtic que presenta una major eficàcia.
18. El tractament amb altes pressions hidrostàtiques incrementa l'activitat de la Tripsina sobre l'Hb quan el substrat i l'enzim es tracten conjuntament i afavoreix el procés d'obtenció d'hidrolitzats descolorats a partir de la FC, la qual cosa permet assolir el mateix grau de descoloració amb una dosi d'enzim inferior. El tractament d'hidròlisi de la FC amb la utilització combinada de Tripsina seguida d'un tractament amb Pepsina permet l'obtenció d'un hidrolitzat proteic d'Hb descolorat i hidrolitza completament la globina, donant lloc a 2 pèptids majoritaris, de 10,8 i 7,4 KDa. Val a dir que també produeix un 60-80 % de nitrogen soluble en TCA, constituït fonamentalment per pèptids petits i aminoàcids lliures.
19. Les millors condicions per deshidratar per atomització els hidrolitzats tripsics i pèpsics d'Hb, obtinguts a partir de FC no pressuritzada, són 180°C a 600 mL·h⁻¹, a partir de les quals s'obté un producte en pols de color blanc (L^* : 91,3; a^* : -0,15 i b^* : 8,1), amb una humitat del 4,7 %, un 84,2 % de proteïna i un 9,7 % de sals minerals. Addicionalment, el procés d'hidròlisi enzimàtica permet una reducció considerable de la microbiota contaminant de la FC, obtenint un producte en pols amb uns recomptes totals de l'ordre de 10^2 - 10^3 ufc·g⁻¹.
20. Pel que fa a la funcionalitat dels hidrolitzats d'Hb deshidratats per atomització, aquests presenten una elevada solubilitat proteica a pH 5 i a pH 7 i romanen solubles després d'un escalfament a 80°C durant 30 min. Tanmateix, malgrat que encara mantenen certa capacitat escumant, el procés d'hidròlisi ha afectat molt negativament la capacitat de mantenir estable l'escuma obtinguda i l'activitat emulsionant.

Bibliografia

- A**dapa, S., Schmidt, K.A. i Toledo, R. 1997. Functional Properties of Skim Milk Processed with Continuous High Pressure Throttling. *J. Dairy Sci.*, 80: 1941-1948.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Hydrolysates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 27 (6): 1256-1262.
- Ahn, D.U i Maurer, A.J. 1990. Poultry Meat Color: Kinds of Heme Pigments and Concentrations of the Ligands. *Poultry Sci.*, 69: 157-165.
- Altarriba, S. 2001. Característiques del poder colorant de la pols de fracció cel·lular de sang de porc. Treball final de carrera de la titulació en Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries. Universitat de Girona.
- A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analysis, 13th ed. Washington, D.C.: International Association of Official Analytical Chemists. 1141 pp.
- Arntfield, S.D., Ismond, M.A.H. i Murray, E.D. 1990. Thermal Analysis of Food Proteins in relation to Processing Effects. A: Harwalkar, V.R. i Ma, C.Y. (eds.). *Thermal Analysis of Foods*. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 51-91.
- Aubes-Dufau, I. i Combes, D. 1997. Effect of Different Proteases on Bitterness of Hemoglobin Hydrolysates. *Appl. Biochem. and Biotechnol.*, 67: 127-138.
- Autio, K. 1983. A New Method for Globin and Heme Preparation from Blood Corpuscle Concentrate. *Proceedings of the European Meeting of Meat Research Workers*, 29 (2): 765-770.
- Autio, K., Kiesvaara, M., Mälkki, Y. i Kanko, S. 1984. Chemical and Functional Properties of Blood Globin Prepared by a New Method. *J. Food Sci.*, 49: 859-862.
- B**alny, C. i Masson, P. 1993. Effects of High Pressure on Proteins. *Food Reviews International*, 9 (4): 611-628.
- Banwart, G.J. 1982. *Microbiología Básica de los Alimentos*. Ed. Bellaterra, S.A., Barcelona. 464 pp. Traducció de: *Basic Food Microbiology*. 1979. The Avi Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut.
- Barbosa-Cánovas, G., Pothakamury, U.R., Palou, E. i Swanson, B.G. 1998. Nonthermal Preservation of Foods. *Food Science and Technology Series*, vol. 82. Ed. Marcel Dekker Inc., New York. 276 pp.

Barco, E., García, R.M, Castillejo, A.M. i Zurera, G. 2000. La Turbidimetría como Método Rápido para la Determinación de Microorganismos Presentes en los Alimentos. *Alimentaria*, 314: 109-112.

Belitz, H.D. i Grosch, W. 1999. *Food Chemistry*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin. 992 pp.

Booren, A.M, i Weis, G.M. 1988. Lean Skeletal Meat Trimmings Incidental to Slaughter. A: Pearson, A.M. i Dutson, T.R. (eds.). *Edible Meat By-products. Advances in Meat Research, Volume 5*. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 219-230.

Bourne, M.C. 1982. *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*. Academic Press Inc., New York, London.

Brennan, J.G. 1996. Spray Drying Techniques for Food Dehydration. *Process Technology, The European Food and Drink Review - Spring 96*: 23-28.

Brennan, J.G. 1989. Dehydration of Foodstuffs. A: Hardman, T.M. (ed.). *Water and Food Quality*. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 33-65.

Brown, M.H. (ed.). 1982. *Meat Microbiology*. Applied Science Publishers Ltd., London-New York. 529 pp.

Bruun-Jensen, L. i Skibsted, L.H. 1996. High-pressure Effects on Oxidation of Nitrosylmyoglobin. *Meat Sci.*, 44 (3): 145-149.

Busquets, E. 1996. Estabilitat del Plasma Sanguini de la Sang de Porc: Evolució de l'Activitat de l'Aigua durant el seu Emmagatzematge i la seva Influència sobre la Qualitat del Producte. Treball final de carrera de la titulació en Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries. Universitat de Girona.

Cadden, AM. 1988. Moisture Sorption Characteristics of Several Food Fibers. *J. Food Sci.*, 53 (4): 1150-1155.

Calderón de la Barca, A.M., Ruiz-Salazar, R.A. i Jara-Marini, M.E. 2000. Enzymatic Hydrolysis and Synthesis of Soy Protein to Improve its Amino Acid Composition and Functional Properties. *J. Food Sci.*, 65 (2): 246-253.

Carlez, A., Veciana-Nogues, T. i Cheftel, J.C. 1995. Changes in Colour and Myoglobin of Minced Beef Meat Due to High Pressure Processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28 (5): 528-538.

Carlin, B. 1972. *Ultrasonica*. Ed. Urmo, Bilbao. 359 pp. Traducció de *Ultrasonics*. 1960. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

Carretero, C. i Parés, D. 1996. Aprofitament de la Sang d'Escorxadors. *IRTA Carn*, 18: 11-12.

Castillo, A., Fernández, M., Falco, S. i Hernández, U. 1997. Isotherma de Adsorción de Fibra Dietética de Naranja. *Alimentaria*, gener-febren 97: 99-100.

Chávez-Jáuregui, R.N., Pitombo, R.N.M., Diano, W. i Touillon, N. 1998. Histéresis de Sorción de Agua del Maiz cusco (*Zea mays L. indurata*) Expandido por Expolsión. *Alimentaria*, gener-febren 98: 61-69.

Cheah, P.B. i Ledward, D.A. 1996. High Pressure Effects on Lipid Oxidation in Minced Pork. *Meat Sci.*, 43 (2): 123-134.

Cheah, P.B. i Ledward, D.A. 1997. Inhibition of Metmyoglobin Formation in Fresh Beef by Pressure Treatment. *Meat Sci.*, 45 (3): 411-418.

Cheftel, J.C. 1992. Effects of High Hydrostatic Pressure on Food Constituents: an Overview. A: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson, P. (eds.). *High Pressure and Biotechnology*. Vol. 224. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd. pp. 195-209.

Cheftel, J.C. i Cheftel, H. 1976. Introducción a la Bioquímica y Tecnología de los Alimentos, Volumen I. Ed. Acribia S.A., Saragossa. 333 pp. Traducció de: Introduction a la Biochimie et a la Technologie des Aliments, Volume I. Technique et Documentation, Lavoisier, París.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L. i Lorient, D. 1989. Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades Funcionales. Valor Nutritivo. Modificaciones Químicas. Ed. Acribia, S.A., Saragossa. 346 pp. Traducció de: Protéines Alimentaires. Biochimie - Propriétés Fonctionelles - Valeur Nutritionnelle - Modifications Chimiques. 1985. Technique et Documentation, Lavoisier, París.

Cheftel, J.C. i Culioli, J. 1997. Effects of High Pressure on Meat: A Review. *Meat Sci.*, 46 (3): 211-236.

Christian, J.H.B. (1983-1984). Actividad de Agua Reducida. A: Silliker, J.H., Elliott, R.P., Baird-Parker, A.C., Bryan, F.L., Christian, J.H.B., Clark, D.S., Olson, J.C. i Roberts, T.A. Comitè editorial. *Ecología Microbiana de los Alimentos 1: Factores que Afectan a la Supervivencia de los Microorganismos en los Alimentos*. Ed. Acribia, S.A., Saragossa. Traducció de: *Microbial Ecology of Foods, Volume I: Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. 1980. Academic Press, Inc., New York. pp. 74-96.

Clydesdale, F.M. 1984. Color Measurement. A: Gruenwedel, D.W. i Whitaker, J.R. (eds.). *Food Analysis. Principles and Techniques*. Vol. 1. Physical Characterization. Marcel Dekker Inc., New York.

Collado, J. 1995. Situación Medioambiental de la Industria Cárnica de Cataluña. *Cárnica 2000*, juliol-agost 95: 43-47.

Collado, J. 1996. Aspectos Medioambientales de los Mataderos. *IRTA Carn*, 18: 10.

Corcuff, N., Pinel, M. i Bourgeois, C.M. 1985. La Décoloration du Sang: Une Nouvelle Voie de Valorisation. *Viandes Prod. Carnés*, 6 (1):10-12.

- D**e Vuono, M., Penteadó, C., Lajolo, F.M., Pereira dos Santos, N. 1979. Functional and Nutritional Properties of Isolated Bovine Blood Proteins. *J. Sci. Food Agric.*, 30: 809-815.
- Defaye, A.B., Ledward, D.A., MacDougall, D.B. i Tester, R.F. 1995. Renaturation of Metmyoglobin Subjected to High Isostatic Pressure. *Food Chemistry*, 52: 19-22.
- Denda, A. i Hayashi, R. 1992. Emulsifying Properties of Pressure-Treated Proteins. A: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson, P. (eds.). *High Pressure and Biotechnology*. Vol. 224. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd. pp. 333-335.
- Dickinson, E. i McClements, D.J. 1996. *Advances in Food Colloids*. Blackie Academic and Professional, Ed. Chapman and Hall, London. 333 pp.
- Dill, C.W. i Landmann, W.A. 1988. Food Grade Proteins from Edible Blood. A: Pearson, A.M. i Dutson, T.R. (eds.). *Edible Meat By-products. Advances in Meat Research, Volume 5*. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 127-145.
- Diniz, F.M. i Martin, A.M. 1997. Fish Protein Hydrolysates by Enzymatic Processing. *Agro-Food-Industry Hi-Tech.*, maig-juny 97: 9-13.
- Diosady, L.L., Rizvi, S.S.H. i Jagdeo, D.J. 1996. Moisture Sorption Isotherms of Canola Meals, and Applications to Packaging. *J. Food Sci.*, 61 (1): 204-208.
- F**elipe, X., Capellas, M. i Law, A.J.R. 1997. Comparison of the Effects of High-Pressure Treatments and Heat Pasteurization on the Whey Proteins in Goat's Milk. *J. Agric. Fodd Chem.*, 45: 627-631.
- Filstrup, P. 1980. Processes and Equipment for Protein By-products in the Meat Industry. A: Grant, R.A. (ed.). *Applied Protein Chemistry*. Applied Science Publishers Ltd., London. pp. 181-222.
- Frazier, W.C. i Westhoff, D.C. 1988. *Food Microbiology*. Fourth edition. McGraw-Hill Book Company, New York. 539 pp.
- Fox, J.B. Jr. i Ackerman, S.A. 1968. Formation of Nitric Oxide Myoglobin: Mechanisms of the Reaction with Various Reductants. *J. Food Sci.*, 33: 364-370.
- Fry, J.C. 1993. One-Way Analysis of Variance. A: Fry, J.C. (ed.). *Biological Data Analysis. A Practical Approach*. Ed. Oxford University Press. 1-39 pp.
- G**alazka, V.B., Ledward, D.A., Dickinson, E. i Langley, K.R. 1995. High Pressure Effects on Emulsifying Behaviour of Whey Protein Concentrate. *J. Food Sci.*, 60 (6): 1341-1343.
- Gill, C.O. 1988. Microbiology of Edible Meat By-products. A: Pearson, A.M. i Dutson, T.R. *Edible Meat By-products. Advances in Meat Research, Volume 5*. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 47-82.

Goldstrand, R.E. 1988. Edible Meat Products: Their Production and Importance to the Meat Industry. A: Pearson, A.M. i Dutson, T.R. (eds.). Edible Meat By-products. Advances in Meat Research, Volume 5. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 1-13.

Gómez Díaz, R. 1992. Actividad del Agua de los Alimentos. Métodos de Determinación. Alimentaria, gener-febrer 92: 77-82.

Gómez-Juárez, C.; Castellanos, R.; Ponce-Noyola, T.; Calderón-Salinas, V. i Figueroa, J. 1999. Functional Properties of Globin Protein obtained from Bovine Blood by Decolorisation of the Red Cell Fraction. J. Sci. Food Agric., 79: 793-796.

Gorbatov, V.M. 1988. Collection and Utilization of Blood and Blood Proteins for Edible Purposes in the USSR. A: Pearson, A.M. i Dutson, T.R. (eds.). Edible Meat By-products. Advances in Meat Research, Volume 5. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 167-195.

Gould, G.W. (ed.). 1995. New Methods of Food Preservation. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London. 324 pp.

Gros, J.B. 1994. L'Activité de l'Eau - Une information "Procédé"? Viandes Prod. Carnés, 15 (6): 166-170.

Gross, M. i Jaenicke, R. 1994. Proteins under Pressure: The Influence of High Hydrostatic Pressure on Structure, Function and Assembly of Proteins and Protein Complexes. European Journal of Biochemistry, 221 (2): 617-630.

Guadix, A, Guadix, E., Páez-Dueñas, M.P., González-Tello, P. i Camacho, F. 2000. Procesos Tecnológicos y Métodos de Control en la Hidrólisis de Proteínas. Ars Pharmaceutica, 41 (1): 79-89.

Guzman, J.C., McMillin, K.W., Bidner, T.D., Dugas-Sims, S. i Godber, J.S. 1995. Texture, Color and Sensory Characteristics of Ground Beef Patties Cointaining Bovine Blood Proteins. J. Food Sci., 60 (4): 657-660.

Hägerdal, B. i Löfqvist, B. 1973. Screening Method Based on Electric Hygrometer for Obtaining Water Sorption Isotherms. J. Agr. Food Chem., 21 (3): 445-450.

Harwalkar, V.R. i Ma, C.Y. (eds.). 1990. Thermal Analysis of Foods. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. 362 pp.

Hayakawa, S., Ogawa, T. i Sato, Y. 1982. Some Functional Properties under Heating of the Globin Prepared by Carboxymethyl Cellulose Procedure. J. Food Sci., 47: 1415-1418.

Hayakawa, S., Matsuura, Y., Nakamura, R. i Sato, Y. 1986. Effect of Heat Treatment on Preparation of Colorless Globin from Bovine Hemoglobin Using Soluble Carboxymethyl Cellulose. J. Food Sci., 51 (3): 786-790, 796.

Hayashi, R. 1992. Utilization of Pressure in Addition to Temperature in Food Science and Technology. In: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson, P. (eds.). High Pressure and Biotechnology. Vol. 224. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd. pp. 185-193.

Homma, N., Ikeuchi, Y. i Suzuki, A. 1994. Effects of High Pressure Treatment on the Proteolytic Enzymes in Meat. *Meat Sci.*, 38: 219-228.

Hoover, D.G. 1993. Pressure Effects on Biological Systems. In: Use of Hydrostatic Pressure in Food Processing Overview, Outstanding Symposia in Food Science and Technology. *Food Technology*, 93: 150-155.

Hoover, D.G. 2000. Ultrasound. *JFS Supplement: Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies*. *J Food Sci.*, 65: 93-95.

Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. i Knorr, D. 1989. Biological Effects of High Hydrostatic Pressure on Food Microorganisms. *Food Technology*, 43 (3): 99-107.

Hubinger, M., Menegalli, F.C., Aguerre, R.J. i Suarez, C. 1992. Water Vapor Adsorption Isotherms of Guava, Mango and Pineapple. *J. Food Sci.*, 57 (6): 1405-1407.

ICMSF. 1983. Microorganismos de los Alimentos. Técnicas de Análisis Microbiológico. Volum I. Ed. Acibia, Saragossa. 431 pp. Traducció de: Microorganisms in Food, I. Their Significance and Methods of Enumeration. The International Association of Microbiological Societies. University of Toronto Press.

Jimenez-Alcaide, L. i Arraiz-Cuesta, L. 1980. Estabilidad de los Alimentos Secos durante el Almacenamiento I: Estudio de Isotermas de Adsorción. *Ingeniería Química*, maig 80: 147-155.

Juoppila, K. i Roos, Y.H. 1994. Water Sorption and Time-Dependent Phenomena of Milk Powders. *J. Dairy Sci.*, 77: 1798-1808.

Kaminski, W. i Al-Bezweni, M. 1994. Calculation of Water Sorption Isotherms for Multicomponent Protein-containing Mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 29: 129-136.

Kanko, S. i Autio, K. 1985. Electrophoretic Studies of Blood Globin Preparations. *J. Chromatography*, 324: 395-406.

Kapsalis, J.G. 1981. Moisture Sorption Hysteresis. A: Water Activity: Influence on Food Quality. Academic Press Inc., New York. pp. 143-177.

Kapsalis, J.G. 1987. Influences of Hysteresis and Temperature on Moisture Sorption Isotherms. A: Rockland, L.B. y Beuchat, L.R. (eds.). Water Activity: Theory and Applications to Food. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 173-213.

Karel, M. 1973. Recent Research and Development in the Field of Low-Moisture and Intermediate-Moisture Foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, febrer 1973: 329-373.

Kendrick, J.L. i Watts, B.M. 1969. Nicotinamide and Nicotinic Acid in Color Preservation of Fresh Meat. *J. Food Sci.*, 34: 292-294.

Knorr, D. 1993. Effects of High-Hydrostatic-Pressure Processes on Food Safety and Quality. A: Use of Hydrostatic Pressure in Food Processing Overview, Outstanding Symposia in Food Science and Technology. *Food Technology*, 93: 156-161.

Knorr, D. 1995. Hydrostatic Pressure Treatment of Food: Microbiology. A: Gould, G.W. (ed.). *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, London. pp.159-175.

Kocher, P.N. i Foegeding, E.A. 1993. Microcentrifuge-based Method for Measuring Water-holding of Protein Gels. *J. Food Sci.*, 58: 1040-1046.

Kolakowski, P. Dumay, E. i Cheftel, J.C. 2001. Effects of High Pressure and Low Temperature on β -Lactoglobulin Unfolding and Aggregation. *Food Hydrocolloids*, 15: 215-232.

Labuza, T.P., Acott, K., Tatini, S.R. i Lee, R.Y. 1976. Water Activity Determination: A Collaborative Study of Different Methods. *J. Food Sci.*, 41: 910-917.

Lahl, W.J. i Braun, S.D. 1994. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. *Food Technology*, octubre 94: 68-71.

Ledward, D.A. i Lawrie, R.A. 1984. Recovery and Utilisation of By-product Proteins of the Meat Industry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34 B (3): 223-228.

Lee, Y., Wang, R.M. i Nakai, S. 1990. Preparation of Colorless Globin from Bovine Hemoglobin using Sodium Alginate. *J. Food Sci.*, 55 (2): 577-578.

Leung, H.K. 1987. Influence of Water Activity on Chemical Reactivity. A: Rockland, L.B. y Beuchat, L.R. (eds.). *Water Activity: Theory and Applications to Food*. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 27-54.

Lewis, M.J. 1990. *Physical Properties of Foods and Food Processing Systems*. Ellis Hordwood Ltd., Chischester. 458 pp.

Liceaga-Gesualdo, A.M. i Li-Chan, E.C.Y. 1999. Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *J. Food Sci.*, 64 (6): 1000-1004.

Lim, L.T., Tang, J. i He, J. 1995. Moisture Sorption Characteristics of Freeze Dried Blueberries. *J. Food Sci.*, 60 (4): 810-814.

Liu, X. Q., Yonekura, M., Tsutsumi, M. i Sano, Y. 1996. Physicochemical Properties of Aggregates of Globin Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 44 (10): 2957-2961.

Liu, X. Q., Yonekura, M., Tsutsumi, M. i Sano, Y. 1997. Self-Assembling of Peptide α -1 of Globin Hydrolysates. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 328-333.

Lorca, C. 2001. Efecte de l'addició de substàncies antioxidants a la fracció cel·lular de sang de porc sobre l'evolució del color de la pols obtinguda mitjançant la deshidratació per atomització. Treball final de carrera de la titulació en Enginyeria Tècnica Agrícola especialitat Indústries Agràries i Alimentàries. Universitat de Girona.

Lynn Knipe, C. 1988. Production and Use of Animal Blood and Blood Proteins for Human Food. A: Pearson, A.M. i Dutson, T.R. (eds.). *Edible Meat By-products. Advances in Meat Research, Volume 5.* Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 147-165.

Ma, C.Y., Harwalkar, V.R. i Maurice, T.J. 1990. Instrumentation and Techniques of Thermal Analysis in Food Research. A: Harwalkar, V.R. i Ma, C.Y. (eds.). *Thermal Analysis of Foods.* Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 1-15.

Maccarrone, E., Maccarrone, A. i Ra. 1987. Colour Stabilization of Orange by Tannic Acid. *Int. J. Food Sci.*, 50: 9.

Mafart, P. 1994. Ingeniería Industrial Alimentaria. Volum I: Procesos Físicos de Conservación. Ed. Acribia, Saragossa. pp. 195-275. 285 pp. Traducció de: Génie Industriel Alimentaire. Tome 1: Les Procédés Physiques de Conservation. 1991. Technique et Documentation-Lavosier, Paris.

Mahmoud, M. 1994. Physicochemical and Functional Properties of Protein Hydrolysates in Nutritional Products. *Food Technology*, octubre 94: 89-95.

Marcos, B. 1997. Método Simple para Determinar la Actividad del Agua en el Rango de Crecimiento Microbiano. *Alimentaria*, juliol-agost 97: 25-27.

Martín Yero, M., García Campos, J., Gutiérrez, S. i González, A. 1995. Tecnología de Deshidratación de la Sangre y sus Fracciones. *Alimentaria*, març 95: 49-53.

McDonald, A.G. 1992. Effects of High Hydrostatic Pressures on Natural and Artificial Membranes. In: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. i Masson, P. (eds.). *High Pressure and Biotechnology. Colloque INSERM 12,* John Libbey Eurotext Ltd. pp. 67-75.

Mitsumoto, M., Faustman, C., Cassens, R.G., Arnold, R.N., Schaefer, D.M. i Scheller, K.K. 1991. Vitamins E and C Improve Pigment and Lipid Stability in Ground Beef. *J. Food Sci.*, 56 (1): 194-197.

Morgan, P. 1985. Traitement du Sang d'Abattoir par Conservateur Biologique. *Actualité Co-Produits, Filiere Viande*, nº 92: 21-23.

Morita, R.Y. 1975. Psychrotrophic Bacteria. *Bact. Rev.*, 39, 144-167.

Morr, C.V. 1985. Composition, Physicochemical and Functional Properties of Reference Whey Protein Concentrates. *J. Food Sci.*, 50: 1406-1421.

Morr, C.V., German, B., Kinsella, J.E., Regenstein, J.M., Van Buren, J.P., Kilara, A., Lewis, B.A. i Mangino, M.E. 1985. A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. *J. Food Sci.*, 50: 1715-1718.

Nakamura, R., Hayakawa, S., Yasuda, K. i Sato, Y. 1984. Emulsifying Properties of Bovine Blood Globin: A Comparison with Some Proteins and Their Improvement. *J. Food Sci.*, 49: 102-104.

Neklyudov, A.D., Ilyukhina, V.P., Mosina, G.I., Petrakova, A.N., Fedorova, N.F. i Kuznetsov, V.D. 1996. Hydrolysis of Protein Substrates by Yeast Proteases. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 32 (2): 213-218.

Novozymes, Novo A/S. 4 febrer 2002. Protein Hydrolysis and Much More. BioTimes. The enzyme e-zine (en línia). Accessible a <http://www.novozymes.com/cgi-bin/bvisapi.dll/biotimes/biotimes.jsp>

Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A. i García-Carmona, F. 1997. Cyclodextrins as Secondary Antioxidants: Synergism with Ascorbic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2830-2835.

Ockerman, H.W. i Hansen, C.L. 1994. Industrialización de subproductos de origen animal. Ed. Acibia, S.A., Saragossa. 387 pp. Traducció de: *Animal By-product Processing*. 1988. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England.

Okamoto, M., Kawamura, Y. i Hayashi, R. 1990. Application of High Pressure to Food Processing: Textural Comparison of Pressure- and Heat-induced Gels of Food Proteins. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54 (1): 183-189.

Olsen, H.S. 1985. Manufacture of New Protein Products for Food Use from Slaughterhouse Blood. Novo Industri A/S, Enzyme R&D Division, Bagsvaerd, Denmark. A-05831a.

Parés, D. 1995. Caracterització Bioquímica i Microbiològica de la Sang Porcina d'Escorxadors Industrials per Determinar la seva Aptitud com a Matèria Primera en l'Elaboració d'Aliments Destinats al Consum Humà. Treball de Recerca del Programa de Doctorat: Microbiologia i Bioquímica Aplicades. Universitat de Girona.

Parés, D. 1998. Caracterització i Revaloració de la Fracció Plasmàtica de la Sang de Porc procedent d'Escorxadors Industrials. Tesi Doctoral, Universitat de Girona.

Parés, D. i Carretero, C. 1996. Influencia de Algunos Factores sobre el Grado de Hemolisis de la Sangre Porcina de Mataderos Industriales. *Alimentaria*, 271: 65-69.

Parés, D. i Carretero, C. 1997. La Sangre de Matadero: Subproducto de la Industria Cárnica. *Cárnica 2000*, agost-setembre 97: 49-54.

Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J.J, Toldrà, M. i Carretero, C. 1998a. DSC Study of the Effects of High Pressure and Spray-drying Treatment on Porcine Plasma. *Journal of Thermal Analysis*, 52: 837-844.

Parés, D., Saguer, E. i Carretero, C. 1998b. Functional Properties of Heat Induced Gels from Liquid and Spray Dried Porcine Blood Plasma as Influenced by pH. *J. Food Sci.*, 63 (6): 958-961.

Parés, D., Saguer, E., Toldrà, M. i Carretero, C. 2000. Effect of High Pressure Processing at Different Temperatures on Protein Functionality of Porcine Blood Plasma. *J. Food Sci.*, 65 (3): 486-490.

Parés, D., Saguer, E., Toldrà, M. i Carretero, C. 2001. High Hydrostatic Pressure as a Method to Reduce Microbial Contamination of Porcine Blood Plasma. *Food Science and Technology International*, 7 (2): 117-121.

Pascual Anderson, M.R. 1992. *Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Ed. Díaz de Santos, Madrid. 360 pp.

Pascual, A., Gisbert, M., Tomas, D. i Lopez, N. 1997. Aplicación de los Ultrasonidos en Tecnología de la Carne y Productos Cárnicos (I). *Alimentación: equipos y tecnología*, juny 97: 75-80.

Pearce K.N. i Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. *J. Agric. Food Chem.*, 26 (3): 716-723.

Pearson, A.M. i Dutson, T.R. 1988. *Edible Meat By-products*. *Advances in Meat Research*, Volume 5. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. 439 pp.

Pedersen, B. 1994. Removing Bitterness from Protein Hydrolysates. *Food Technology*, octubre 94: 96-98.

Peña-Ramos, E.A. 2001. Fractionation Of Hydrolyzed Whey Protein Isolates and Characterization for Antioxidant Activity. 2001 IFT Annual Meeting, New Orleans, LA. (en línia). Accessible a http://ift.confex.com/ift/2001/techprogram/paper_9250.htm

Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Sayas-Barberá, M.E. i Cartagena-Gracia, R. 1998. Caracterización de los Parámetros de Color de diferentes Materias Primas usadas en la Industria Cárnica. *Eurocarne*, 63, gener-febrer 98: 115-122.

Petersen, D., Nielsen, P.M. i Dammann, C. 1995. Determination of the Degree of Hydrolysis (DH) Based on OPA Reaction. *Novo Nordisk A/S, Denmark*, ED-9512723.

Phillips, L.G.; Yang, S.T. i Kinsella, J.E. 1991. Neutral Salt Effects on Stability of Whey Protein Isolate Foams. *J. Food. Sci.*, 56 (2): 588-589.

Pinel, M. 1985. Etat des Techniques de Traitement du Sang. *Viandes Prod. Carnés*, 6 (2): 53-57.

- Pisecky, J. 1992. Water Activity of Milk Powders. *Milchwissenschaft*, 47 (1): 3-7.
- Pittia, P., Wilde, P.J., Husband, F.A. i Clark, D.C. 1996. Functional and Structural Properties of β -lactoglobulin as Affected by High Pressure Treatment. *J. Food Sci.*, 61 (6): 1123-1128.
- Pohlman, F.W., Dikeman, M.E. i Zayas, J.F. 1997. The Effect of Low-intensity Ultrasound Treatment on Shear Properties, Color Stability and Shelf-life of Vacuum-packaged Beef *semitendinosus* and *biceps femoris* Muscles. *Meat Sci.*, 45 (3): 329-337.
- Pomeranz, Y. 1991. Functional properties of food components. 2^a ed. Academic Press, Inc., London. 571 pp.
- Potter, N.N. i Hotchkiss, J.H. 1995. Food Science. 5 th edition. Ed. Chapman and Hall, New York. 608 pp.
- Qi**, M., Hettiarachchy, N.S. i Kalapathy, U. 1997. Solubility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolates Modified by Pancreatin. *J. Food Sci.*, 62 (6): 1110-1115.
- Raeker**, M.Ö. i Johnson, L.A. 1995. Thermal and Functional Properties of Bovine Blood Plasma and Egg White Proteins. *J. Food Sci.*, 60 (4): 685-690.
- Ramplung, M.W. 1990. Blood Viscosity Characteristics and Red Cell Aggregation. A: Carter, R.E. (ed.). *Rheology of Food, Pharmaceutical and Biological Materials with General Rheology*. Elsevier Science Publishers Ltd., London. pp. 101-112.
- Ranken, M.D. 1980. Applications of Blood Proteins. A: Grant, R.A. (ed.). *Applied Protein Chemistry*. Applied Science Publishers Ltd., London. pp. 169-180.
- Roberts, D. 1982. Bacteria of Public Health Significance. A: Brown, M.H. (ed.). *Meat Microbiology*. Applied Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 319-386.
- Robinson, D.S. 1991. Bioquímica y Valor Nutritivo de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A., Saragossa. Traducción de: *Food - Biochemistry and Nutritional Value*. Longman Group UK Ltd., London.
- Rockland, L.B. i Beuchat, L.R. (eds.). 1987. *Water Activity: Theory and Applications to Food*. Marcel Dekker, Inc., New York. 404 pp.
- Rockland, L.B. i Nishi, S.K. 1980. Influence of Water Activity on Food Product Quality and Stability. *Food Technol.*, 34 (4): 42, 44-46, 48-51, 59.
- Rodríguez, I. 1994. Aprovechamiento de Subproductos de la Industria Cárnica. *Alimentación: equipos y tecnología*, abril 94: 69-73.
- Roos, Y.H. 1993. Water Activity and Physical State Effects on Amorphous Food Stability. *J. Food Process. Preserv.*, 16: 433-447.

Russell, N.J., Evans, R.I., ter Steeg, P.F., Hellemons, J., Verheul, A. i Abee, T. 1995. Membranes as a Target for Stress Adaptation. *International Journal of Food Microbiology*, 28: 255-261.

Sanjuan, R.M., Blasco, M. i Galotto, M.J. 1994. Análisis Térmicos: DSC en Alimentos. *Alimentación: equipos y tecnología*, gener-febren 94: 99-106.

Sato, Y., Hayakawa, S. i Hayakawa, M. 1981. Preparation of Blood Globin through Carboxymethyl Cellulose Chromatography. *J. Food Technol.*, 16: 81-91.

Satterlee, L.D. 1975. Improving Utilization of Animal By-products for Human Foods - A Review. *J. Animal Sci.*, 41(2): 687-697.

Shahidi, F. i Pegg, R.B. 1991. Encapsulation of the Pre-Formed Cooked Cured-Meat Pigment. *J. Food Sci.*, 56 (6): 1500-1504, 1518.

Sharma, S.K., Mulvaney, S.J. i Rizvi, S.S.H. 2000. *Food Process Engineering: Theory and Laboratory Experiments*. John Wiley & Sons, Inc., New York. 348 pp.

Singh, P.C. i Singh, R.K. 1996. Application of GAB Model for Water Sorption Isotherms of Food Products. *J. Food Process. Preserv.*, 20 (3): 203-220.

Sopade, P., Ajisegiri, E. i Abass, A. 1996. Moisture Sorption Isotherms of Dawadawa, a Fermented African Locust Bean (*Parkia biglobosa* Jacq. Benth). *Food Control*, 7 (3): 153-156.

Stryer, L. 1995. *Bioquímica*, Quarta edició. Volum I. Ed. Reverté, S.A., Barcelona. 440 pp. Traducció de: *Biochemistry*, Fourth edition. 1995. W. H. Freeman and Co., New York.

Sullivan, J.A. 21 desembre 2001. Human Red Blood Cells. Cell Galery. Cells Alive! (en línia). Accessible a <http://www.cellsalive.com/index.htm>

Suzuki, K. 1960. Studies on the Kinetics of Protein Denaturation under High Pressure. *Rev. Phys. Chem. Japan*, 29: 49-56.

Swingler, G.R. 1982. *Microbiology of Meat Industry By-products*. A: Brown, M.H. (ed.). *Meat Microbiology*. Applied Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 179-224.

Synowiecki, J., Jagielka, R. i Shahidi, F. 1996. Preparation of Hydrolysates from Bovine Red Blood Cells and their Debittering Following Plastein Reaction. *Food Chemistry*, 57 (3): 435-439.

Tewari, G., Jayas, D.S. i Holley, R.A. 2001. High Pressure Processing of Foods: An Overview. *Fresher Under Pressure Scientific Research* (en línia). Publicat primer a: *Science Des Aliments*, 19 (1999): 619-661. Accessible a http://www.fresherunderpressure.com/science_hpp_review.htm

- Texture Technologies Corp., Stable Micro Systems, Ltd. 2001. (en línea). Accessible a http://texturetechnologies.com/texture_profile_analysis.html
- Toldrà, M. i Carretero, C. 1998. Isoformas de Sorción de la Fracción Celular de la Sangre de Cerdo Deshidratada por Atomización según el Modelo GAB. *Alimentaria*, 294: 45-51.
- Toldrà, M., Saguer, E., Felip, P., Parés, D. i Carretero, C. 2000. Efecto de la adición de Sustancias Antioxidantes a la Fracción Celular de la Sangre de Cerdo sobre el Oscurecimiento producido durante la Deshidratación por Atomización. *Alimentación: equipos y tecnología*, 3, abril 00: 53-58.
- Toldrà, M., Busquets, A., Saguer, E., Parés, D. i Carretero, C. 2002. Effects of High Hydrostatic Pressure Treatment on Porcine Blood Red Cells Fraction. *Food Science and Technology International*, 8 (1): 41-48.
- Toledo, R.T. 1991. *Fundamentals of Food Process Engineering*. 2nd. ed. Van Nostrand Reinhold, New York. pp. 456-506.
- Tritt, W.P. i Schuchardt, F. 1992. Materials Flow and Possibilities of Treating Liquid and Solids Wastes from Slaughterhouses in Germany – A Review. *Bioresource Tech.*, 41: 201-207.
- Troller, J.A. 1989. *Water Activity and Food Quality*. A: Hardman, T.M. (ed.). Water and Food Quality. Ed. Elsevier Science Publishers Ltd., London-New York. pp. 1-31.
- Tybor, P.T., Dill, C.W. i Landmann, W.A. 1973. Effect of Decolorization and Lactose Incorporation on the Emulsification Capacity of Spray-dried Blood Protein Concentrates. *J. Food Sci.*, 38 (1): 4-7.
- Tybor, P.T., Dill, C.W. i Landmann, W.A. 1975. Functional Properties of Protein Isolated from Bovine by Continuous Pilot Process. *J. Food Sci.*, 40 (1): 155-159.
- U**chman, W., Konieczny, P. i Krysztofiak, K. 1994. Some Properties of the Globin Preparation Obtained by Enzymatic Decolouration of Red Cell Fraction. 40th International Congress of Meat Science and Technology, The Hague, Holanda.
- V**alladares, C., Espinosa, R. i Martín, M. 1995. Una Contribución al Estudio del Efecto de las Radiaciones Gamma sobre Sangre en Polvo. *Alimentaria*, maig 95: 75-77.
- Van Camp, J. 1996. High Hydrostatic Pressure-Induced Denaturation, Aggregation, and Gel Formation of Foods Proteins. Ph. D Thesis, University of Gent, Belgium.
- Van Camp, J., Feys, G. i Huyghebaert, A. 1996. High Pressure-Induced Gel Formation of Haemoglobin and Whey Proteins at Elevated Temperatures. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 29: 49-57.
- Venegas Fornias, O. 1995. *Procesamiento de Subproductos Animales Comestibles*. Estudios FAO: Producción y Sanidad Animal, Cuaderno Técnico FAO nº 123, 1995, Roma. 167 pp.

Vidal, G. i Bornhardt, C. 1991. La Actividad del Agua en los Alimentos. Alimentación: equipos y tecnología, setembre 91: 159-163.

Vidal, D., Gimeno, V., Fito, P. i Tarrazo, J. 1986. La Actividad del Agua en los Alimentos. Alimentación: equipos y tecnología, setembre-octubre 86, 37-46.

Wismer-Pedersen, J. 1979. Utilization of Animal Blood in Meat Products. Food Technol., Agost 79: 76-80.

Wismer-Pedersen, J. 1988. Use of Haemoglobin in Foods - A Review. Meat Sci., 24 (1): 31-45.

Wolf, M., Walker, J. i Kaspalis, J. 1972. Water Vapor Sorption Hysteresis in Dehydrated Food. J. Agr. Food Chem., 20 (5): 1073-1077.

Yang, J-H. i Lin, C-W. 1996. Effects of Various Viscosity Enhancers and pH on Separating Haem from Porcine Red Blood Cells. J. Sci. Food Agric., 70 (3): 364-368.

Yang, J-H. i Lin, C-W. 1998. Functional Properties of Porcine Blood Globin Decolourized by Different Methods. Int. J. Food Sci. and Technology, 33: 419-427.

Zamora, L.M. 2000. Aplicación de Bacterias del Ácido Láctico com Cultivo Bioprotector en la Bioconservación de Sangre de Cerdo Procedente de Matadero Industrial. Treball de Recerca del Programa de Doctorat de Biotecnologia, Universitat de Girona.

Zayas, J.F. 1997. Functionality of Proteins in Food. Springer-Verlag, Berlin. 370 pp.

Ziajka, S., Dzwolak, W. i Zbikowski, Z. 1993. The Influence of Enzimatic Modification on Some Properties of Casein Hydrolysates. A: Schwencke, K.D. i Mothes, R. (eds.). Food Proteins: Structure and Functionality. VCH, Weinheim-New York. 363 pp.

Ziajka, S., Dzwolak, W. i Zubel, J. 1994. The Effect of Processing Variables on Some Properties of Whey Protein Hydrolysates. Milchwissenschaft, 49 (7): 382-385.

ANNEX 1 Conservació de la fracció cel·lular mitjançant la deshidratació per atomització i caracterització del producte en pols

1.a: Determinació de les condicions de deshidratació per atomització de la fracció cel·lular hemolitzada

ANOVA: Efecte de la temperatura de deshidratació per atomització sobre el contingut en humitat de la FC en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	4	0,26	14,56	0,0000
Error	41	0,18		
C total	45	0,4		

ANOVA: Efecte de la temperatura de deshidratació per atomització sobre la solubilitat proteica de la FC en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	4	0,20	16,83	0,0000
Error	37	0,11		
C total	41	0,32		

ANOVA: Efecte de la deshidratació per atomització sobre la variació de l'Entalpia de transició del procés de desnaturalització proteica (ΔH) de la FC hemolitzada.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	5	0,06	5,98	0,0015
Error	20	0,04		
C total	25	0,09		

ANOVA: Efecte de la deshidratació per atomització sobre la temperatura de desnaturalització proteica (Td) de la FC hemolitzada.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	5	118,57	43,20	0,0000
Error	25	13,72		
C total	30	132,29		

1.b: Caracterització microbiològica de la fracció cel·lular

ANOVA: Efecte del tractament d'hemòlisi (ultrasons i centrifugació) i de la deshidratació per atomització sobre els recomptes de mesòfils de la FC.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	2	12,57	20,47	0,0000
Error	27	8,29		
C total	29	20,85		

ANOVA: Efecte de la deshidratació per atomització sobre els recomptes de *S. aureus* de la FC hemolitzada.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	1	6,91	22,03	0,0002
Error	18	5,64		
C total	19	12,55		

ANOVA: Efecte de la deshidratació per atomització sobre els recomptes de Clostridis sulfit reductors de la FC hemolitzada.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	1	11,14	33,48	0,0000
Error	18	5,99		
C total	19	17,13		

ANNEX 2 Estabilització del color de la fracció cel·lular deshidratada per atomització per utilitzar-la com a colorant alimentari

2a: Efectes de la concentració d'àcid ascòrbic sobre els paràmetres L*a*b* del color de la FC en pols i la seva evolució durant el període d'emmagatzematge (resultats de l'ANOVA).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor L*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,008	3,37	0,0349
Mostra	4	0,023	10,02	0,0003
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,003	22,21	0,0001
Temps*concentració	52	0,001	2,28	0,0001
Temps*mostra	52	0,003	7,08	0,0001
Valor a*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	1,04	168,7	0,0001
Mostra	4	0,02	2,35	0,0987
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,53	815,7	0,0001
Temps*concentració	52	0,01	3,80	0,0001
Temps*mostra	52	0,01	6,07	0,0001
Valor b*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,06	17,33	0,0001
Mostra	4	0,02	6,11	0,0035
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,04	129,94	0,0001
Temps*concentració	52	0,01	9,75	0,0001
Temps*mostra	52	0,02	14,38	0,0001

2.b: Efecte de la concentració de glucosa sobre els paràmetres L*a*b* del color de la FC en pols i la seva evolució durant el període d'emmagatzematge (resultats de l'ANOVA).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor L*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,05	9,93	0,0003
Mostra	4	0,01	1,69	0,2016
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,02	133,05	0,0001
Temps*concentració	52	0,001	1,26	0,1337
Temps*mostra	52	0,005	8,71	0,0001

(continua)

Continuació efecte de la concentració de glucosa sobre els paràmetres L*a*b* del color:

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor a*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,01	1,64	0,2139
Mostra	4	0,03	5,30	0,0065
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,47	3661,1	0,0001
Temps*concentració	52	0,006	11,91	0,0001
Temps*mostra	52	0,005	9,75	0,0001
Valor b*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,03	4,94	0,0087
Mostra	4	0,02	4,03	0,0190
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,09	222,51	0,0001
Temps*concentració	52	0,002	0,99	0,4989
Temps*mostra	52	0,03	18,21	0,0001

2c: Efectes de la concentració de dextrina sobre els paràmetres L*a*b* del color de la FC en pols i la seva evolució durant el període d'emmagatzematge (resultats de l'ANOVA).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor L*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,01	1,78	0,1829
Mostra	4	0,06	7,51	0,0013
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,007	34,51	0,0001
Temps*concentració	52	0,001	0,80	0,8236
Temps*mostra	52	0,004	4,79	0,0001
Valor a*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,034	2,26	0,1079
Mostra	4	0,05	3,26	0,0390
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,49	2184,1	0,0001
Temps*concentració	52	0,01	9,83	0,0001
Temps*mostra	52	0,005	5,97	0,0001
Valor b*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,02	1,99	0,1453
Mostra	4	0,08	6,76	0,0022
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,07	159,56	0,0001
Temps*concentració	52	0,003	1,74	0,0034
Temps*mostra	52	0,01	6,83	0,0001

2d: Efectes de la concentració de cisteïna sobre els paràmetres L*a*b* del color de la FC en pols i la seva evolució durant el període d'emmagatzematge (resultats de l'ANOVA).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor L*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,01	0,57	0,6870
Mostra	4	0,14	9,44	0,0004
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,033	40,56	0,0001
Temps*concentració	52	0,003	1,02	0,4405
Temps*mostra	52	0,013	7,62	0,0001
Valor a*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	3,46	70,66	0,0001
Mostra	4	0,08	1,71	0,1965
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	3,38	1843,5	0,0001
Temps*concentració	52	0,21	28,31	0,0001
Temps*mostra	52	0,05	6,96	0,0001
Valor b*				
Efectes <i>between-subjects</i>				
Concentració	4	0,19	6,42	0,0028
Mostra	4	0,33	10,46	0,0002
Efectes <i>within-subjects</i>				
Temps	13	0,26	145,57	0,0001
Temps*concentració	52	0,01	1,64	0,0079
Temps*mostra	52	0,23	33,39	0,0001

2e: Efectes de la concentració d'àcid nicotínic sobre els paràmetres L*a*b* del color de la FC en pols i la seva evolució durant el període d'emmagatzematge (resultats de l'ANOVA).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor L*				
Efectes <i>between subjects</i>				
Concentració	4	521,2	4,79	0,0287
Mostra	2	264,5	4,86	0,0415
Efectes <i>within subjects</i>				
Temps	13	33,23	23,15	0,0001
Temps*concentració	52	6,75	1,18	0,2404
Temps*mostra	26	18,91	6,58	0,0001

(continua)

Continuació efectes de la concentració d'àcid nicotínic sobre els paràmetres L*a*b* del color:

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor a*				
Efectes <i>between subjects</i>				
Concentració	4	1192,9	109,69	0,0001
Mostra	2	50,9	9,36	0,0080
Efectes <i>within subjects</i>				
Temps	13	736,7	534,59	0,0001
Temps*concentració	52	18,5	3,36	0,0001
Temps*mostra	26	5,28	1,92	0,0113
Valor b*				
Efectes <i>between subjects</i>				
Concentració	4	301,9	23,61	0,0002
Mostra	2	42,5	6,64	0,0200
Efectes <i>within subjects</i>				
Temps	13	43,9	106,79	0,0001
Temps*concentració	52	2,68	1,63	0,0173
Temps*mostra	26	3,48	4,24	0,0001

2f: Efectes de la concentració de nicotínamida sobre els paràmetres L*a*b* del color de la FC en pols i la seva evolució durant el període d'emmagatzematge (resultats de l'ANOVA).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor L*				
Efectes <i>between subjects</i>				
Concentració	4	120,6	5,37	0,0213
Mostra	2	1,30	0,12	0,8922
Efectes <i>within subjects</i>				
Temps	13	18,67	22,20	0,0001
Temps*concentració	52	4,55	1,35	0,0965
Temps*mostra	26	23,19	13,80	0,0001
Valor a*				
Efectes <i>between subjects</i>				
Concentració	4	182,6	39,52	0,0001
Mostra	2	9,18	3,98	0,0632
Efectes <i>within subjects</i>				
Temps	13	677,3	2476,3	0,0001
Temps*concentració	52	11,44	10,45	0,0001
Temps*mostra	26	8,33	15,23	0,0001
Valor b*				
Efectes <i>between subjects</i>				
Concentració	4	19,81	5,24	0,0227
Mostra	2	3,14	1,66	0,2493
Efectes <i>within subjects</i>				
Temps	13	23,24	92,29	0,0001
Temps*concentració	52	1,27	1,26	0,1583
Temps*mostra	26	9,32	18,50	0,0001

ANNEX 3 Higienització de la fracció cel·lular mitjançant el tractament amb altes pressions hidrostàtiques (HHP)

3.a: Efecte de la durada del tractament HHP a 400 MPa a 20°C sobre la microbiota contaminant, la solubilitat proteica i la viscositat de la fracció cel·lular (experiments preliminars)

ANOVA: Efecte de la durada del tractament HHP (a 400 MPa i a 20°C) sobre el temps de detecció del creixement de la microbiota de la FC.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	3	3,35	229,84	0,0000
Error	8	0,04		
C total	11	3,39		

ANOVA: Efecte de la durada del tractament HHP (a 400 MPa i a 20°C) sobre els microorganismes aerobis mesòfils de la FC.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	3	20,70	48,83	0,0000
Error	8	1,13		
C total	11	21,83		

ANOVA: Efecte de la durada del tractament HHP (a 400 MPa i a 20°C) sobre solubilitat a pH 7 i a pH 4,5 de la FC.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH 7				
Model	3	0,35	29,50	0,0001
Error	8	0,03		
C total	11	0,38		
pH 4,5				
Model	3	0,02	1,39	0,3151
Error	8	0,05		
C total	11	0,07		

ANOVA: Efecte de la durada del tractament HHP (a 400 MPa i a 20°C) sobre la viscositat de la FC.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	3	0,11	17,14	0,0008
Error	8	0,02		
C total	11	0,12		

3.b: Efecte del tractament HHP sobre la microbiota contaminant de la FC

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre els microorganismes aerobis mesòfils de la FC respecte de les mostres no tractades (control) (A) i efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra en les mostres tractades (B).

A

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	1	19,19	95,03	0,0000
Error	33	6,67		
C total	34	25,86		

B

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Temperatura	2	1,37	12,07	0,0038
Temps	1	2,35	41,44	0,0002
Mostra	4	1,33	5,88	0,0165
Temperatura*temps	2	0,04	0,34	0,7194
Temperatura*mostra	8	0,62	1,37	0,3319
Temps*mostra	4	0,13	0,57	0,6917
Error	8	0,45		
C total	29	6,30		

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre la velocitat de creixement i el temps de generació dels microorganismes supervivents de la FC respecte de les mostres no tractades (control) (A) i efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra en les mostres tractades (B).

A

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Velocitat de creixement				
Model	1	0,035	87,4940	0,0000
Error	23	0,009		
C total	24	0,044		

Temps de generació

Model	1	1,18	37,69	0,0000
Error	23	0,72		
C total	24	1,89		

B

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Velocitat de creixement				
Temperatura	2	0,0002	1,31	0,3901
Temps	1	0,001	13,47	0,0350
Mostra	3	0,002	9,61	0,0477
Temperatura*temps	2	0,0001	0,79	0,5292
Temperatura*mostra	6	0,001	2,56	0,2353
Temps*mostra	3	0,001	2,46	0,2400
Error	3	0,002		
C total	20	0,007		

(continua)

Continuació efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra sobre velocitat de creixement i el temps de generació en les mostres tractades per HHP (B):

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Temps de generació				
Temperatura	2	0,02	0,70	0,5644
Temps	1	0,13	8,77	0,0294
Mostra	3	0,20	4,53	0,1231
Temperatura*Temps	2	0,01	0,34	0,7337
Temperatura*mostra	6	0,13	1,51	0,3960
Temps*mostra	3	0,03	0,64	0,6406
Error	3	0,04		
C total	20	0,69		

3.c: Efecte del tractament HHP sobre els paràmetres de color de la fracció cel·lular

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre la lluminositat (L*) de la FC respecte de les mostres no tractades (control) (A) i per l'efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra en les mostres tractades (B).

A

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	1	9,46	35,26	0,0000
Error	31	8,31		
C total	32	17,77		

B

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Temperatura	2	4,40	13,86	0,0037
Temps	1	0,22	1,37	0,2809
Mostra	4	1,71	2,69	0,1200
Temperatura*Temps	2	0,52	1,63	0,2616
Temperatura*mostra	8	3,79	2,99	0,0835
Temps*mostra	4	0,57	0,89	0,5167
Error	7	1,11		
C total	28	12,46		

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre la coordenada a* de la FC respecte de les mostres no tractades (control) (A) i per l'efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra en les mostres tractades (B).

A

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	1	57,66	39,84	0,0000
Error	32	46,31		
C total	33	103,96		

(continua)

Continuació efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra sobre la coordenada a* en les mostres tractades per HHP (B):

B

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Temperatura	2	0,71	0,27	0,7689
Temps	1	13,66	10,54	0,0141
Mostra	4	3,16	0,61	0,6693
Temperatura*Temps	2	4,43	1,71	0,2485
Temperatura*mostra	8	3,26	0,32	0,9363
Temps*mostra	4	10,24	1,97	0,2030
Error	7	9,08		
C total	28	43,65		

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre la coordenada b* de la FC en comparació amb les mostres no tractades (control) (A) i per l'efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra en les mostres tractades (B).

A

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	1	8,08	36,99	0,0000
Error	33	7,21		
C total	34	15,29		

B

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Temperatura	2	1,05	3,36	0,0871
Temps	1	1,47	9,43	0,0153
Mostra	4	0,68	1,10	0,4204
Temperatura*temps	2	0,22	0,70	0,5240
Temperatura*mostra	8	0,85	0,68	0,6999
Temps*mostra	4	1,56	1,85	0,2111
Error	8	1,24		
C total	29	6,66		

3.d: Efecte del tractament HHP sobre la solubilitat proteica de la fracció cel·lular

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre la solubilitat a pH 7 i a pH 4,5 de la FC respecte de les mostres no tractades (control) (A) i per l'efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra en les mostres tractades (B).

A

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH 7				
Model	1	0,28	26,38	0,0000
Error	30	0,32		
C total	31	0,60		

(continua)

Continuació efecte del tractament HHP sobre la solubilitat a pH 7 i 4,5 de la FC respecte de les mostres no tractades (control) (A) i per l'efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra en les mostres tractades (B).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH 4,5				
Model	1	0,004	0,73	0,3983
Error	29	0,15		
C total	30	0,16		

B

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH 7				
Temperatura	2	0,08	8,19	0,0147
Temps	1	0,16	33,46	0,0007
Mostra	4	0,07	3,61	0,0670
Temperatura*temps	2	0,0004	0,04	0,9593
Temperatura*mostra	8	0,04	1,11	0,4516
Temps*mostra	4	0,02	0,78	0,5718
Error	7	0,03		
C total	28	0,48		

pH 4,5

Temperatura	2	0,06	5,41	0,0326
Temps	1	0,007	1,22	0,3011
Mostra	4	0,11	4,91	0,0269
Temperatura*temps	2	0,03	2,69	0,1282
Temperatura*mostra	8	0,06	1,37	0,3338
Temps*mostra	4	0,03	1,16	0,3962
Error	8	0,04		
C total	29	0,33		

3.e: Efecte del tractament HHP sobre la viscositat de la fracció cel·lular

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre la viscositat de la FC respecte de les mostres no tractades (control) (A) i per l'efecte de la temperatura i el temps de tractament i la mostra en les mostres tractades (B).

A

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	1	0,56	9,34	0,0044
Error	33	1,98		
C total	34	2,54		

B

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Temperatura	2	0,20	16,53	0,0014
Temps	1	1,32	218,95	0,0000
Mostra	4	0,18	7,46	0,0083
Temperatura*temps	2	0,14	11,30	0,0047

(continua)

Continuació efecte de la temperatura, el temps de tractament i la mostra sobre la viscositat de la FC en les mostres tractades per HHP (B).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Temperatura*mostra	8	0,05	1,10	0,4477
Temps*mostra	4	0,04	1,77	0,2272
Error	8	0,05		
C total	29	1,97		

3.f: Efectes del tractament HHP (400 MPa, 20°C, 15 min) i la deshidratació per atomització (140°C) sobre la microbiota contaminant, el color i les propietats funcionals de la fracció cel·lular.

ANOVA: Efecte del tractament HHP i la deshidratació per atomització sobre els recomptes totals de microorganismes aerobis mesòfils de la FC.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	3	42,47	118,99	0,0000
Error	15	1,78		
C total	18	44,25		

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre els paràmetres CIE L*a*b* del color de la FC en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Valor L*				
Model	1	0,02	0,006	0,9412
Error	8	33,13		
C total	9	33,15		
Valor a*				
Model	1	3,59	0,98	0,3511
Error	8	29,28		
C total	9	32,87		
Valor b*				
Model	1	0,14	0,155	0,7057
Error	7	6,18		
C total	8	6,32		

ANOVA: Efecte del tractament HHP i del pH sobre la solubilitat proteica de la FC en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Tractament	1	0,16	26,78	0,0066
pH	1	0,21	34,95	0,0041
Mostra	4	0,11	4,56	0,0853
Tractament*pH	1	0,01	2,38	0,1975
Tractament*mostra	4	0,007	0,29	0,8684
pH*mostra	4	0,015	0,61	0,6767
Error	4	0,02		
C total	19	0,53		

ANOVA: Efecte del tractament HHP i del pH sobre la capacitat escumant de la FC en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Tractament	1	18209,4	81,12	0,0008
pH	1	11971,7	53,34	0,0019
Mostra	4	6099,2	6,79	0,0452
Tractament*pH	1	1329,4	5,92	0,0717
Tractament*mostra	4	1363,6	1,52	0,3477
pH*mostra	4	3105,8	3,46	0,1283
Error	4	897,8		
C total	19	42977,1		

ANOVA: Efecte del tractament HHP i del pH sobre el percentatge d'escuma estable de la FC en pols als 60, 90 i 120 min de repòs.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
% escuma a t=60 min				
Tractament	1	0,004	2,09	0,2219
pH	1	0,16	77,11	0,0009
Mostra	4	0,03	3,97	0,1052
Tractament*pH	1	0,005	2,48	0,1906
Tractament*mostra	4	0,007	0,81	0,5782
pH*mostra	4	0,06	7,09	0,0420
Error	4	0,008		
C total	19	0,27		
% escuma a t=90 min				
Tractament	1	0,006	3,45	0,1369
pH	1	0,13	83,72	0,0008
Mostra	4	0,03	4,58	0,0849
Tractament*pH	1	0,01	8,72	0,0418
Tractament*mostra	4	0,005	0,71	0,6276
pH*mostra	4	0,03	4,71	0,0812
Error	4	0,006		
C total	19	0,22		
% escuma a t=120 min				
Tractament	1	0,007	2,19	0,1689
pH	1	0,103	34,00	0,0100
Mostra	4	0,007	0,74	0,5948
Tractament*pH	1	0,01	3,79	0,1465
Tractament*mostra	4	0,005	0,51	0,7001
pH*mostra	4	0,02	1,59	0,3670
Error	3	0,01		
C total	197	0,17		

ANOVA: Efecte del tractament HHP i la concentració de FC sobre l'activitat emulsionant de la FC en pols a pH 4,5 i pH 7.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH 4,5				
Tractament	1	0,0003	1,23	0,2837
Concentració	4	0,102	95,17	0,0000
Mostra	2	0,001	1,26	0,3110
Tractament*concentració	5	0,001	0,87	0,5239
Concentració*mostra	18	0,004	0,79	0,6909
Tractament*mostra	4	0,008	7,64	0,0012
Error	16	0,004		
C total	53	0,15		
pH 7				
Tractament	1	0,01	21,83	0,0003
Concentració	4	0,501	331,35	0,0000
Mostra	2	0,002	2,06	0,1595
Tractament*concentració	5	0,002	1,27	0,3246
Concentració*mostra	18	0,01	1,31	0,2970
Tractament*mostra	4	0,001	0,79	0,5445
Error	16	0,006		
C total	53	0,64		

ANOVA: Efecte del tractament HHP i del pH sobre l'activitat emulsionant de la FC en pols en funció de la concentració de FC (0,25; 0,5; 1 %).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
0,25 %				
Tractament	1	0,001	3,39	0,1627
pH	1	0,08	204,06	0,0007
mostra	4	0,001	1,00	0,5209
Tractament*pH	1	0,001	2,04	0,2489
Tractament*mostra	4	0,0001	0,08	0,9816
pH*mostra	4	0,003	1,70	0,3454
Error	3	0,001		
C total	18	0,101		
0,5 %				
Tractament	1	0,003	11,49	0,0275
pH	1	0,023	80,04	0,0009
Mostra	4	0,004	3,77	0,1135
Tractament*pH	1	0,003	10,26	0,0328
Tractament*mostra	4	0,003	2,73	0,1769
pH*mostra	4	0,001	0,87	0,5533
Error	4	0,001		
C total	19	0,04		

(continua)

Continuació efecte del tractament HHP i del pH sobre l'activitat emulsionant de la FC en pols en funció de la concentració de FC (0,25; 0,5; 1 %).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
1 %				
Tractament	1	0,001	1,39	0,3042
pH	1	0,0002	0,26	0,6386
Mostra	4	0,004	1,54	0,3422
Tractament*pH	1	0,003	5,55	0,0780
Tractament*mostra	4	0,003	1,03	0,4879
pH*mostra	4	0,0006	0,25	0,8986
Error	4	0,002		
C total	19	0,014		

ANOVA: Efecte del tractament HHP i del pH sobre el percentatge d'aigua retinguda (CRA) de les pastes formades per escalfament de solucions de FC en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Tractament	1	0,0003	0,43	0,5586
pH	1	2,04	3042,8	0,0000
Mostra	4	0,006	2,09	0,2858
Tractament*pH	1	0,001	1,95	0,2574
pH*mostra	4	0,006	2,11	0,2830
Tractament*mostra	4	0,003	1,25	0,4457
Error	3	0,002		
C total	18	2,51		

ANOVA: Efecte del tractament HHP i del pH sobre els paràmetres de textura de les pastes formades per escalfament de la FC en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Duresa				
Tractament	1	31,93	9,53	0,0367
pH	1	202,18	60,35	0,0015
Mostra	4	7,94	0,59	0,6879
Tractament*pH	1	13,86	4,14	0,1117
pH*mostra	4	2,61	0,19	0,9290
Tractament*mostra	4	4,32	0,32	0,8505
Error	4	13,40		
C total	19	276,2		
Elasticitat				
Tractament	1	0,003	7,71	0,0500
pH	1	0,014	36,68	0,0042
Mostra	4	0,003	1,84	0,2847
Tractament*pH	1	0,0004	1,00	0,3739
pH*mostra	4	0,003	1,59	0,3316
Tractament*mostra	4	0,0007	0,43	0,7818
Error	4	0,002		
C total	19	0,03		

(continua)

Continuació efecte del tractament HHP i del pH sobre els paràmetres de textura de les pastes formades per escalfament de la FC en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Adhesivitat				
Tractament	1	0,12	2,00	0,2521
pH	1	1,28	37,69	0,0001
Mostra	4	0,14	0,79	0,5759
Tractament*pH	1	0,20	3,37	0,1635
pH*mostra	4	0,05	0,28	0,8408
Tractament*mostra	4	0,11	0,45	0,7749
Error	3	0,18		
C total	17	2,17		

ANOVA: Efecte del tractament HHP sobre la duresa de les pastes formades per escalfament de la FC en pols a pH 4,5 i pH 7.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH 4,5				
Model	1	1,86	2,04	0,1907
Error	8	7,27		
C total	9	9,13		
pH 7				
Model	1	43,93	16,74	0,0035
Error	8	20,99		
C total	9	64,93		

ANNEX 4 Obtenció d'hidrolitzats proteics descolorats a partir de la fracció cel·lular

4.a: Aplicació de l'alta pressió hidrostàtica sobre l'obtenció d'hidrolitzats proteics d'hemoglobina.

ANOVA: Efecte del tractament d'hidròlisi en funció de si el tractament HHP s'aplica abans o després de l'addició dels enzims sobre el grau d'hidròlisi (% GH) assolit als hidrolitzats d'Hb.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	5	0,12	28,71	0,0000
Error	18	0,02		
C total	23	0,13		

ANOVA: Efecte del tractament d'hidròlisi en funció de si el tractament HHP s'aplica abans o després de l'addició dels enzims sobre el nitrogen no proteic (% NNP/NT) als hidrolitzats d'Hb.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	5	1,38	37,81	0,0000
Error	22	0,16		
C total	27	1,54		

4.b: Determinació de les condicions de deshidratació per atomització dels hidrolitzats T+P d'hemoglobina.

ANOVA: Efecte de la temperatura de deshidratació per atomització sobre el contingut en humitat dels hidrolitzats T+P d'Hb.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	2	1,02	1,149	0,3471
Error	13	5,74		
C total	15	6,75		

ANOVA: Efecte de la temperatura de deshidratació per atomització sobre la solubilitat proteica a pH 5 dels hidrolitzats T+P d'Hb.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	2	0,003	0,316	0,7349
Error	12	0,05		
C total	14	0,06		

ANOVA: Efecte de la temperatura de deshidratació per atomització sobre els paràmetres L*a*b* del color dels hidrolitzats T+P d'Hb.

Font de variació	g. II.	SQ	F	Prob > F
Valor L*				
Model	2	3,76	4,57	0,0335
Error	12	4,94		
C total	14	8,70		
Valor a*				
Model	2	0,02	0,45	0,6486
Error	12	0,33		
C total	14	0,35		
Valor b*				
Model	2	0,40	0,18	0,8346
Error	12	13,11		
C total	14	13,51		

4.c: Caracterització microbiològica dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització.

ANOVA: Efecte de la hidròlisi amb Tripsina i Pepsina i de la deshidratació per atomització sobre els recomptes de microorganismes aerobis mesòfils de la FC.

Font de variació	g. II.	SQ	F	Prob > F
Model	2	143,92	104,36	0,0000
Error	30	20,69		
C total	32	164,60		

4.d: Propietats funcionals dels hidrolitzats T+P d'Hb deshidratats per atomització.

ANOVA: Efecte de la deshidratació per atomització i del pH (5 i 7) sobre la solubilitat proteica de l'hidrolitzat T+P d'Hb en pols.

Font de variació	g. II.	SQ	F	Prob > F
Tractament	1	0,02	19,62	0,0114
pH	1	0,001	1,13	0,3472
Mostra	4	0,03	7,36	0,0395
Tractament*pH	1	0,001	1,13	0,3472
Tractament*mostra	4	0,03	7,36	0,0395
pH*mostra	4	0,004	1,00	0,5000
Error	4	0,004		
C total	19	0,08		

ANOVA: Efecte del pH sobre la capacitat escumant de l'hidrolitzat T+P d'Hb en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
Model	1	1921,83	3,503	0,0982
Error	8	4389,62		
C total	9	6311,45		

ANOVA: Efecte del temps de repòs sobre el percentatge d'escuma estable formada amb l'hidrolitzat T+P d'Hb en pols, a cada pH (5 i 7).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH 5				
Model	5	4,62	65,07	0,0000
Error	23	0,33		
C total	28	4,94		
pH 7				
Model	5	5,25	382,88	0,0000
Error	24	0,07		
C total	29	5,31		

ANOVA: Efecte del pH (5 i 7) sobre el percentatge d'escuma estable formada amb l'hidrolitzat T+P d'Hb en pols als 10, 20, 30, 45 i 60 min de repòs.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
10 min				
Model	1	0,08	5,42	0,0528
Error	7	0,10		
C total	8	0,18		
20 min				
Model	1	0,03	1,87	0,2085
Error	8	0,12		
C total	9	0,14		
30 min				
Model	1	0,02	2,25	0,1720
Error	8	0,08		
C total	9	0,10		
45 min				
Model	1	0,01	2,12	0,1832
Error	8	0,05		
C total	9	0,07		
60 min				
Model	1	0,01	1,43	0,2666
Error	8	0,04		
C total	9	0,05		

ANOVA: Efecte del pH i la concentració sobre l'activitat emulsionant de l'hidrolitzat T+P d'Hb en pols.

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH	1	0,44	364,79	0,0000
concentració	5	0,29	48,23	0,0000
Mostra	1	0,02	3,60	0,0251
pH*concentració	5	0,16	27,72	0,0000
pH*mostra	4	0,01	2,18	0,1128
concentracio*mostra	20	0,02	1,14	0,3915
Error	18	0,02		
C total	57	0,90		

ANOVA: Efecte de la concentració (%) sobre l'activitat emulsionant de l'hidrolitzat T+P d'Hb en pols, a cada pH (5 i 7).

Font de variació	g. ll.	SQ	F	Prob > F
pH 5				
Model	5	0,01	6,41	0,0006
Error	24	0,01		
C total	29	0,02		
pH 7				
Model	5	0,42	28,98	0,0000
Error	22	0,06		
C total	27	0,48		