

## Treball final de grau

**Estudi:** Grau en Enginyeria Agroalimentària

**Títol:** Caracterització de melses de porcí com a font de proteïnes per la indústria alimentària

**Document:** Memòria

**Alumne:** Xavier Morera Casas

**Tutor:** Carme Carretero Romay i Mònica Toldrà Alegret  
**Departament:** Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària  
**Àrea:** Tecnologia dels Aliments

**Convocatòria (mes/any):** Setembre 2016



**Universitat de Girona**

**Escola Politècnica Superior**

**Caracterització de melses de porcí com a font de  
proteïnes per la indústria alimentària**

**Vist-i-plau directores**

**Carne Carretero Romay i Mònica Toldrà Alegret**

TFG segons el que es disposa en els plans d'estudis d'Enginyeria Agroalimentària  
especialitat en Indústries Agràries i Alimentàries de la Universitat de Girona

Autor

Xavier Morera Casas

# AGRAÏMENTS

M'agradaria agrair a les meves tutores, la Mònica Toldrà i la Carme Carretero, tota la seva ajuda i els consells que m'han donat durant aquests mesos, tant al laboratori com durant la redacció del treball.

També vull agrair al Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària per permetre'm realitzar aquest treball seguint la línia d'investigació tant interessant i gràcies a la qual he après molt, tant pel què fa al tema del projecte com a utilitzar tècniques que mai havia utilitzat.

A la Dolors Parés, l'Elena Saguer i l'Anna Maria Aymerich, per ajudar-me, aconsellar-me i resoldre'm dubtes sempre que ho necessitava.

A la Roser per donar-me ànims sempre que ho necessitava i fer-me un cop de mà en la cerca d'articles.

Gràcies als meus companys de pis, amics i família per tot el suport rebut per realitzar aquest treball.

# ÍNDEX

<b>RESUM.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Situació actual del consum de proteïna.....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Principals fonts de proteïna .....	3
1.1.2. Fonts de proteïna d'origen animal alternatives.....	5
<b>1.2. Subproductes d'origen animal.....</b>	<b>5</b>
1.2.1. Revalorització i aprofitament dels subproductes .....	7
1.2.1.1 Sang.....	8
1.2.1.2. Pell i peülles.....	9
1.2.1.3. Carn provinent de retalls d'ossos i carn separada mecànicament .....	9
1.2.1.4. Greix .....	9
<b>1.3. Òrgans i glàndules .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Característiques i utilitat dels principals òrgans i glàndules .....	11
1.3.1.1. Cervell.....	11
1.3.1.2. Cor .....	11
1.3.1.3. Ronyons.....	12
1.3.1.4. Fetge.....	12
1.3.1.5. Pulmons .....	13
1.3.1.6. Estómac.....	13
1.3.1.7. Testicles.....	13
1.3.1.8. Timus .....	13
1.3.1.9. Llengua .....	14
<b>1.4. Melsa .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Possibilitats d'obtenció de proteïnes amb valor nutricional i/o propietats tecnofuncionals a partir de la melsa .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAL I MÈTODES .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Disseny experimental .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Procedència de les mostres.....</b>	<b>23</b>
<b>3.3. Preparació de la mostra.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Anàlisi microbiològica .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Determinació del pH.....</b>	<b>25</b>
<b>3.6. Caracterització fisicoquímica.....</b>	<b>25</b>
3.6.1. Humitat .....	25
3.6.2. Cendres .....	26
3.6.3. Proteïna (TKN).....	26

3.6.4. Greixos .....	27
3.6.5. Quantitat d'hidroxiprolina / col·lagen .....	28
3.6.6. Contingut de ferro (Fe) .....	29
<b>3.7. Solubilitat proteica .....</b>	<b>31</b>
<b>3.8. Electroforesi SDS-PAGE.....</b>	<b>32</b>
<b>3.9. Anàlisi calorimètrica diferencial (DSC) .....</b>	<b>36</b>
<b>3.10. Anàlisi estadística de les dades .....</b>	<b>39</b>
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>40</b>
4.1. Experiments preliminars .....	40
4.2. Recompte de microorganismes aerobis mesòfils .....	41
4.3. Caracterització fisicoquímica.....	42
4.4. Solubilitat proteica .....	45
4.5. Electroforesi SDS-PAGE.....	48
4.6. Anàlisi calorimètrica diferencial (DSC) .....	51
4.7. Discussió global dels resultats més rellevants i perspectives de futurs estudis .....	54
<b>5. CONCLUSIONS .....</b>	<b>56</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>57</b>

# LLISTAT DE FIGURES

<b>Figura 1.1.</b> Diagrama de flux de les principals sortides de subproductes carnis .....	8
<b>Figura 1.2.</b> Localització de la melsa en el porc .....	14
<b>Figura 1.3.</b> Cara parietal i cara medial de la melsa de porc .....	15
<b>Figura 1.4.</b> Distribució de la polpa vermella i blanca de la melsa .....	17
<b>Figura 1.5.</b> Sinusoide (esquerra) i secció longitudinal d'un sinusoide (dreta).....	17
<b>Figura 1.6.</b> El plat <i>Rolled Pig's Spleen</i> dissenyat per Fergus Henderson .....	19
<b>Figura 3.1.</b> Esquema del procediment experimental dut a terme en el treball.....	22
<b>Figura 3.2.</b> Melsa procedent de l'escorxadador .....	24
<b>Figura 3.3.</b> Diagrama esquemàtic dels components d'un espectrofotòmetre d'absorció atòmica .....	30
<b>Figura 3.4.</b> Aparell d'absorció atòmica SpectrAA Varian 50 B Atomic Absorption Spectrometrer.....	31
<b>Figura 3.5.</b> Aparell Multi-tasca PhastSystem .....	34
<b>Figura 3.6.</b> Exemple de corbes obtingudes per DSC, on es mostra la desnaturalització de les proteïnes .....	37
<b>Figura 3.7.</b> Funcionament teòric del DSC.....	37
<b>Figura 3.8.</b> Calorímetre Diferencial d'Escaneig (DSC) Q 2000 de TA Instruments .....	38
<b>Figura 4.1.</b> Solubilitat proteica de les melses de porc en funció del pH. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard de les mitjanes (n=5). Les lletres diferents mostren diferències significatives per l'efecte del pH ( $P<0,05$ ).....	46

**Figura 4.2. A, B, C i D.** Gels obtinguts per SDS-PAGE dels extractes proteics procedents de melsa de porc. **A i B:** gels homogenis de 12,5 % de poliacrilamida; **C i D:** gels homogenis de 20 % de poliacrilamida; essent M1: marcador de pes molecular de rang 10-220 kDa; M2: marcador de pes molecular baix de rang 3.4-100 kDa; mostres s5.5, s6.5 i s7.5: sobrenedants a diferents pHs; mostres p5.5, p6.5 i p7.5: *pellets* a diferents pHs..... 49

**Figura 4.3. A, B i C:** Termogrames obtinguts per DSC de 3 mostres diferents de melses de porc. Velocitat d'escalfament:  $3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{m}^{-1}$ .....52

# LLISTAT DE TAULES

<b>Taula 1.1.</b> Composició nutricional de les carns més consumides.....	5
<b>Taula 1.2.</b> Subproductes comestibles aptes per ser venuts.....	7
<b>Taula 3.1.</b> Registre de pesos de les melses a l'arribada al laboratori. Es mostren els valors del pes de cada repetició formada per 3 melses i la mitjana $\pm$ desviació estàndard (n=3).....	23
<b>Taula 3.2.</b> Mètodes de separació utilitzats en la SDS-PAGE pels gels homogenis de 12.5% i 20%.....	35
<b>Taula 4.1.</b> Resultats de la caracterització fisicoquímica de les melses en els estudis preliminars. Es mostren valors de la mitjana $\pm$ desviació estàndard (n=2).....	40
<b>Taula 4.2.</b> Resultats de la caracterització fisicoquímica de les melses de porc. Es mostren valors de la mitjana $\pm$ desviació estàndard (n=5) i es comparen amb valors obtinguts en altres estudis.....	42
<b>Taula 4.3. (a)</b> Resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) de la solubilitat proteica de la melsa de porc segons el pH (pH 5.5, 6.5 i 7.5). .....	47
<b>Taula 4.3. (b)</b> Resultats del test de separació de mitjanes HSD Tukey. Es mostren les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis de la solubilitat proteica segons el tractament. Es basa en les mitjanes observades. Utilitza la mida de la mostra de la mitjana harmònica = 5 .....	47
<b>Taula 4.4.</b> Propietats tèrmiques de les melses de porc obtingudes mitjançant DSC. Velocitat d'escalfament: 3 °C·m <sup>-1</sup> . Es mostren valors de la mitjana $\pm$ desviació estàndard (n=3).....	53



## RESUM

L'objectiu principal d'aquest treball va ser determinar la quantitat i qualitat de proteïna de la melsa amb l'objectiu de valorar si podria ser destinada a possibles aplicacions a la indústria càrnica. En un futur proper, es preveu que la proteïna d'origen animal podria ser escassa, degut a l'augment de població mundial i a l'increment de consum de proteïna càrnica.

La melsa és molt desconeguda pel consumidor. Dins del grup de subproductes del porc són molt més coneguts la sang, el fetge, el peus, les orelles, els ronyons i aquests són molt més valorats tant pels consumidors com per la indústria càrnica. Això fa que es tracti d'un òrgan de molt poc valor econòmic, tot i que amb els valors de proteïna obtinguts en el present treball es pot deduir que es malbaraten al voltant de 700 tones a l'any de proteïna animal a Catalunya.

En aquest treball s'ha fet una anàlisi microbiològica de la melsa on s'ha demostrat que té un nivell de qualitat higiènica acceptable pel consum humà on el valor d'aerobis mesòfils és de 4.9 unitats logarítmiques. També es va fer una caracterització fisicoquímica on es va determinar el contingut de proteïna, la humitat, el greix i les cendres. També es va determinar el contingut de ferro total i el percentatge d'hidroxiprolina, a partir del qual es pot obtenir el valor de col·lagen present a la melsa. A partir dels resultats, es confirma que el valor de proteïna de la melsa és al voltant del 17%, la humitat al voltant del 80%, el greix al voltant del 3%, al voltant de l'1.3% de part mineral, un alt contingut en ferro (319.69 ppm) i un baix contingut de col·lagen (1.60%), i els resultats estan d'acord amb els valors mostrats a la bibliografia consultada.

A més, també es va determinar la solubilitat proteica de les melses en tres condicions de pH diferents, (5.5, 6.5 i 7.5) i es va comprovar que com més alt era el pH, més alt era el percentatge de solubilitat proteica. Essent del 34% al tractament de pH més baix i del 54 % al tractament de pH més alt. Aquesta tendència fa pensar que és possible que augmentant el pH per sobre de 7.5 el percentatge de proteïna soluble seria major.

També es va fer una anàlisi electroforètica mitjançant SDS-PAGE per saber quines proteïnes hi ha presents a la melsa. Es van sotmetre a aquesta tècnica les fraccions solubles (sobrenedant) i insolubles (*pellet*) dels extractes de la determinació de la solubilitat. Es va observar que les proteïnes més fàcilment identificables eren proteïnes de la sang i del

múscul llis. Concretament, als gels es van apreciar bandes d'alta intensitat corresponents a les subunitats de l'hemoglobina i ferritina amb un pes molecular (PM) d'entre 15 i 20 kDa, l'actina amb un PM de 42 kDa, el fibrinogen on la cadena  $\gamma$  té un PM de 47 kDa, la cadena  $\beta$  té un PM de 56 kDa i la cadena  $\alpha$  té un PM de 63.5 kDa. A més, les globulines, o bé l'albumina de la sang amb un PM de 68 kDa també es reflecteixen en bandes d'alta intensitat. Per altra banda, es van apreciar bandes d'intensitat molt més moderada on es troba la miosina amb un PM de 20 kDa, immunoglobulines de plasma sanguini o catepsines (A,B i D) amb un PM de 30 kDa i el col·lagen de 129 kDa.

L'anàlisi calorimètrica diferencial de rastreig o DSC (*Differential scanning calorimetry*) va ser una altra tècnica utilitzada al treball per caracteritzar l'estabilitat de la proteïna nativa. Els resultats obtinguts als termogrames presentaven dos pics endotèrmics: un amb el mínim del pic endotèrmic al voltant de 68 °C corresponent al col·lagen i l'altre al voltant dels 86 °C corresponent a l'actina.

Pel que fa a les propietats tecnològiques, no ha estat possible fer un estudi en el present treball, ja que es necessita més quantitat de mostra per extreure tota la proteïna necessària i poder fer els assajos pertinents. Malgrat aquest inconvenient, l'alt contingut de proteïna de la melsa i que una part important d'aquestes proteïnes són solubles fan pensar que el concentrat de proteïna d'aquest òrgan tindria bones propietats tecnològiques aplicables a la indústria càrnia, ja siguin propietats texturitzants, emulsionants o gelificants. També seria convenient fer testos organolèptics pel color i el flavor que podria aportar.

De cara a les característiques nutricionals, la proteïna és un nutrient important d'alt valor biològic i seria interessant fer un aminograma per quantificar la presència de cada aminoàcid, si té tots els essencials i poder-ne determinar el seu valor biològic.

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. Situació actual del consum de proteïna

D'acord amb les previsions de la FAO, l'augment de població i l'increment de consum de proteïna càrnica, amb la capacitat de producció actual, d'aquí quinze o vint anys la quantitat de proteïna animal procedent dels animals de granja "tradicionals" no serà suficient per cobrir tota la demanda. De fet, ja en certs països es comença a explorar la possibilitat de menjar proteïna procedent d'insectes. És més, de cara al 2050 el món necessitarà entre un 70 i 100% més de quantitat de menjar i s'ha de tenir en compte la competitivitat que tenen els productors pel maneig de les terres, el cost d'alimentació i d'aigua del bestiar i la necessitat de frenar els efectes negatius de la producció de menjar envers al medi ambient (Godfray *et al.*, 2010). Per altra banda, el rendiment dels porcs sacrificats en termes de proteïna està infravalorat, i hi ha una sèrie de vísceres que es consumeixen molt poc, i que tenen, per tant, molt poc valor comercial, tot i que podrien representar un increment en el rendiment proteic del sacrifici dels porcs.

Amb aquest treball es volen estudiar les característiques de la melsa de porc per saber si tindria cabuda al mercat i alhora revaloritzar aquest subproducte del porc, del qual no se n'extreu cap ús, perquè passi de ser considerat com un residu a una font de proteïna pels consumidors. A més, ens trobem a una zona geogràfica on es maten milers de porcs al dia, i això encara dóna més importància a aquest estudi per la contínua innovació del sector càrnic.

### 1.1.1. Principals fonts de proteïna

Les proteïnes estan formades per aminoàcids i n' existeixen una vintena de diferents que es troben a les plantes i animals. Una proteïna normal pot contenir uns 300 aminoàcids o més, que formen una seqüència específica. Segons la disposició i combinació d'aquesta seqüència d'aminoàcids, la proteïna que es forma durà a terme una funció específica a l'organisme.

A partir de la dieta obtenim els aminoàcids essencials que, a diferència dels no essencials, no són produïts pel propi organisme de forma endògena a partir d'altres proteïnes. La leucina, isoleucina, valina, treonina, metionina, fenilalanina, triptòfan i lisina es consideren

aminoàcids essencials indispensables per les persones. En el cas dels infants, a part dels esmentats anteriorment, també s'hi afegeix la histidina.

Les proteïnes es troben en diferents aliments, ja que totes les cèl·lules animals i vegetals contenen proteïnes però la quantitat i qualitat present en els aliments varia considerablement degut a la quantitat i tipus d'aminoàcids. A més, el valor biològic de les proteïnes animals és més elevat que el de les vegetals. El valor biològic es determina segons la quantitat d'aminoàcids essencials necessaris que conté una proteïna per la dieta dels humans. De manera que si els conté tots o pràcticament tots en la quantitat necessària per la dieta humana es diu que aquella proteïna té un valor biològic alt. En canvi, quan un o més aminoàcids són presents però en quantitats insuficients, s'entén que aquella proteïna té un valor biològic baix (EUFIC, 2008).

Les fonts alimentàries de proteïnes d'alt valor biològic són la carn, el peix, els ous i la llet. En el cas de les fonts alimentàries de proteïnes de baix valor biològic s'hi troben els llegums, els cereals, els fruits secs (FEC, 2013), les llavors i les verdures (EUFIC, 2008).

Segons el Codi Alimentari Espanyol, s'entén com a carn les "parts comestibles dels músculs de bovins, ovins, suïds, caprins, èquids i camèlids sans, sacrificats en condicions higièniques ja siguin criats en règim extensiu, règim intensiu, caça de pèl i ploma i mamífers marins". Cal destacar les característiques nutricionals d'aquesta que aporta entre un 16 i un 22% de proteïnes d'alt valor biològic, i és una bona font de vitamina B12. També és rica en ferro del tipus hemo, aporta minerals com el zinc, potassi, fòsfor, i en menor mesura, calci i magnesi. I a més, el contingut de greix i colesterol depèn del tipus d'espècie, la peça, i també de l'edat de l'animal i de la seva alimentació. Per altra banda, les vísceres són pobres en vitamina A, vitamina C, àcid fòlic i hidrats de carboni (FEC, 2013).

A la Taula 1.1. es pot veure la composició nutricional per 100 grams de carn de les espècies més consumides.

Tanmateix, les altres fonts alimentàries d'alt valor biològic, com és el cas dels ous, tenen proteïnes de molt bona qualitat i alt valor biològic, ja que la clara de l'ou està composta majoritàriament per l'albumina que és la proteïna amb més valor biològic. Pel que fa al peix, aquest aporta entre un 18 i un 20% de proteïnes d'alt valor biològic. I per últim, en els productes làctics, en especial la llet, es pot comprovar com les proteïnes làcties són d'alt valor biològic, ja que presenten tots els aminoàcids essencials per cobrir les necessitats nutricionals d'una persona (FEC, 2013).

**Taula 1.1.** Composició nutricional de les carns més consumides.

(<http://www.fundaciondelcorazon.com/nutricion/alimentos/carne.html>)

	<b>Proteïna (%)</b>	<b>Greix (%)</b>	<b>Kilocalories (Kcal/100g)</b>	<b>Colesterol (mg/100g)</b>	<b>Àcids grassos saturats (%)</b>
<b>Vedella</b>	19	11	181	70	3.4
<b>Porc</b>	16	25	290	72	11.5
<b>Pollastre desossat</b>	20.5	4.3	121	87	1.4
<b>Xai</b>	17	19	248	78	9.4
<b>Conill</b>	22	8	162	65	2.6
<b>Fetge de vedella</b>	19	3.8	140	300	1.2

Per mantenir una renovació normal de les proteïnes necessària pel creixement adequat i la reparació dels teixits corporals, es recomana que entre el 10 i 15% de la nostra ingesta total d'energia hauria de procedir de proteïnes. Aquesta ingesta s'aproxima al voltant de 0.75 grams de proteïna per quilogram de pes corporal per dia, el que equival a dues o tres racions de proteïna animal o quatre de diferents proteïnes vegetals (EUFIC, 2008).

### **1.1.2. Fonts de proteïna d'origen animal alternatives**

Normalment la proteïna animal més consumida, deixant de banda ous i derivats, peix i productes làctics és a través de la carn (peça noble o múscul). Ara bé, hi ha una sèrie de vísceres comestibles i que en molts casos són desaprofitades i també serien una font extra de proteïna pel consum humà, ja que moltes d'elles s'utilitzen per l'alimentació animal. Entre aquestes s'hi troba la sang, la pell, els ossos, retalls de peces de carn, teixits grassos, banyes, peülles, peus, cranis i òrgans (Toldrà *et al.*, 2012).

## **1.2. Subproductes d'origen animal**

No tot el que s'obté dels animals són peces nobles, sinó que queden residus en gran quantitat, inclús superant el 50% del pes inicial, amb una gran diversitat de característiques fisicoquímiques dels quals es pot treure un rendiment.

Es denomina subproducte animal totes aquelles parts de l'animal que no formen part de la canal, que deriven del sacrifici de l'animal, que siguin comestibles i s'hagin obtingut en

condicions sanitàries i hagin estat sotmeses a inspecció veterinària (Ockerman i Hansen, 1994).

Les indústries on es processen aliments carnis, com és el cas d'escorxadors, sales de desfer o carnisseries, produeixen unes quantitats molt elevades de subproductes sòlids i líquids desaprofitats que contenen un contingut molt elevat de proteïna i greix. No obstant, molts d'aquests subproductes no s'utilitzen directament per l'alimentació humana o animal, sinó que si és possible, en molts dels casos, s'intenta recuperar els nutrients útils per l'alimentació a través de la tecnologia. En aquestes ocasions, els tractaments mecànics com són la mòlta, tractament per calor, centrifugació i l'assecamment han de ser suficients per obtenir subproductes útils per l'alimentació. Tot i que, hi ha casos que cal aplicar mètodes més sofisticats i tractaments químics.

En el cas de les indústries processadores d'aliments càrnics, la majoria de subproductes desaprofitats consisteixen principalment en productes sòlids o semi-sòlids com els ossos, tendons, greix, vísceres, sang, pèl, peülles i plomes. Al mateix temps, en aquestes indústries es produeixen grans volums d'efluents líquids en forma d'aigua de rentat, però en aquest cas el contingut de proteïna i greix no és elevat per la composició del subproducte desaprofitat, sinó que ho és pel gran volum d'efluent generat. A l'aigua de rentat se li sol aplicar un tractament amb l'ajuda de sulfat fèrric que actua com a coagulant per separar-ne la matèria orgànica, i a partir d'aquest procés, s'estima que es produeixen de 0.83 a 8.7 quilograms de combustible en forma de biomassa per metre cúbic d'aigua de rentat tractada (Rahman, 2014).

Perquè un subproducte d'origen animal pugui ser utilitzat, es necessiten certs requeriments per al seu processament (Rodríguez, 1994):

- ha d'existir un procés econòmic i tècnic viable, que converteixi el subproducte animal en un producte aprofitable per a la indústria.
- ha d'existir un mercat per al subproducte.
- s'ha de generar en una quantitat suficient perquè el seu processament sigui viable.
- s'ha de poder conservar i emmagatzemar, abans i després del seu processament.

### 1.2.1. Revalorització i aprofitament dels subproductes

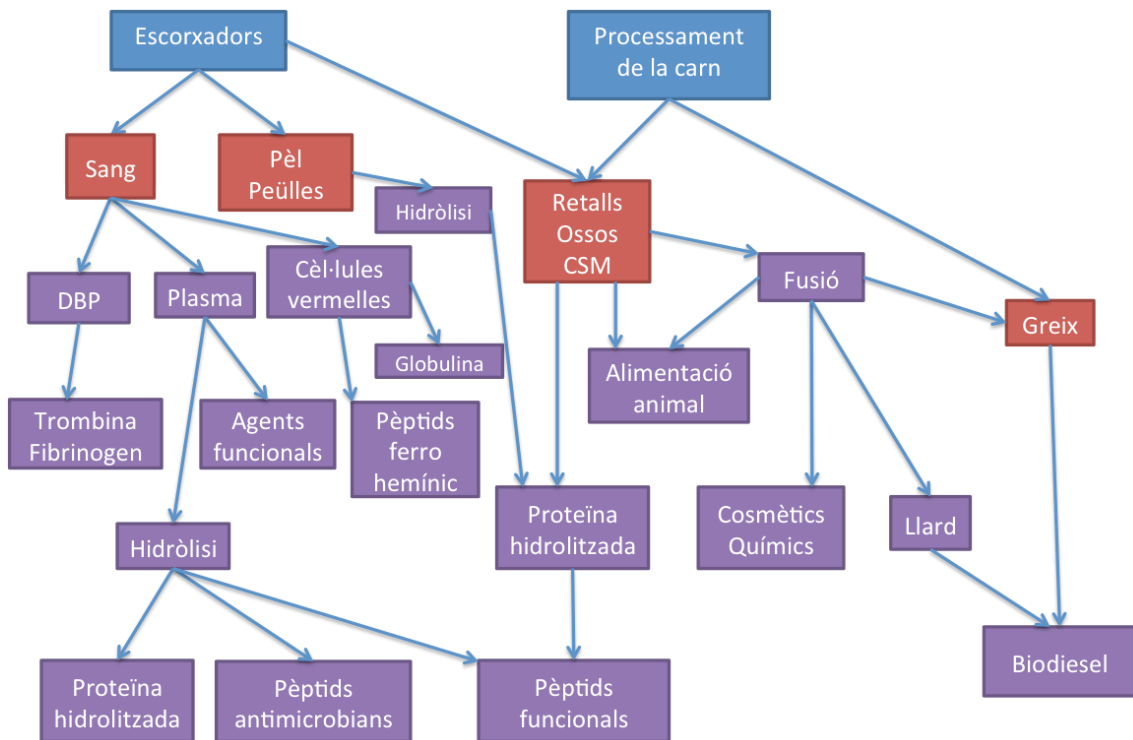
Els subproductes i efluents malgastats són una font molt valuosa com a matèria primera si són tractats correctament, i més quan es genera una quantitat tan significativa com succeeix a Catalunya on es sacrifiquen 19 milions de porcs a l'any (Rude, 2016). Concretament al nucli de Riudellots de la Selva, es sacrifica el 69% dels porcs de la demarcació de Girona, el que equival a 5.5 milions de porcs a l'any segons dades corresponents al 2014 (Costa-Pau i Carreras, 2015). De mode que tenen una repercussió econòmica molt positiva al generar la producció de nous productes i ingredients funcionals amb un alt valor afegit. És convenient processar tots els subproductes en productes valorats, per l'alimentació humana, alimentació animal, alimentació d'animals de companyia, productes farmacèutics, fertilitzants i inclús per la generació de biodièsel. A la Taula 1.2. es poden observar els principals subproductes aptes a la venda.

**Taula 1.2.** Subproductes comestibles aptes per ser venuts (Jayathilakan *et al.*, 2012).

Espècie	Porc
	%
Vendes	100
Carcassa sencera	77.5
Sang	3
Teixits grassos	3
Pell	6
Òrgans	7
Cap	5.9
Vísceres (pit i abdomen)	10
Peus	2
Cua	0.1
Cervell	0.1

S'han desenvolupat diverses tecnologies de revalorització dels subproductes carnis arreu del món però de vegades han tingut problemes d'implementació, ja que és complicat trobar la combinació idònia d'ús de tecnologies innovadores, mètodes de processament i el màrqueting adequat pel producte. Amb aquest grau d'innovació s'aconsegueix que els subproductes siguin atractius pels consumidors, passant de ser una matèria primera a un aliment comestible, i si no és possible que siguin comestibles, es destinen a altres productes dels quals es pot treure algun rendiment econòmic com és la fabricació de plàstics, productes farmacèutics, generació d'energia i pinsos per alimentació animal (figura 1.1).

En el cas dels subproductes comestibles, aquests són una font excel·lent d'aminoàcids essencials, minerals i vitamines. A més, es poden utilitzar com a estabilitzants, millorants de propietats sensorials com són el color, textura i sabor, i també s'utilitzen com a millorants de funcions tecnològiques, ja sigui com a emulgents o agents formadors d'enllaços d'aigua per retenir-la al producte (Toldrà *et al.*, 2012).



**Figura 1.1.** Diagrama de flux de les principals sortides de subproductes carnis (Toldrà *et al.*, 2012).  
CSM: Carn Separada Mecànicament. DBP: Proteïna de Sang Defibrinada.

### 1.2.1.1 Sang

La sang és una de les fonts de proteïna més importants i infrautilitzada que genera la indústria càrnica. Es pot trobar en forma líquida i deshidratada. S'utilitza en formulació de molts productes alimentaris, tan destinats pel consum humà com per a l'alimentació animal. Ara bé, a partir de diferents tècniques és possible separar les cèl·lules vermelles del plasma, i així, s'obté un producte molt més valuós i amb més sortida al mercat que la sang deshidratada (Grant, 1980).



#### **1.2.1.2. Pell i peülles**

El destí principal de la pell i les peülles és l'obtenció de gelatina i medicaments. De fet, la gelatina és feta de pell i ossos com a matèria primera en condicions comestibles, i el seu component principal és el col·lagen. Aquesta proteïna també té propietats emulgents perquè pot lligar i retenir grans quantitats de greix. Així, aquesta capacitat fa de la gelatina un ingredient molt interessant per a la indústria càrnia (Jayathilakan *et al.*, 2012).

#### **1.2.1.3. Carn provinent de retalls d'ossos i carn separada mecànicament**

La carn provinent de retalls normalment s'utilitza per l'elaboració de productes de xarcuteria. En canvi, la carn adherida als ossos, anomenada carn separada mecànicament (CSM), es pot separar d'ells per un sistema d'alta pressió i s'utilitza per reduir costos. A la indústria càrnia s'utilitza com a ingredient en productes emulsionats o picats segons la legislació de cada país. Aquesta CSM pot tenir un alt contingut en calci (Ockerman i Hansen, 1994).

#### **1.2.1.4. Greix**

Els greixos es separen en greixos comestibles i no comestibles. Generalment, el greix de porc fos es denomina llard, i aquest, es pot descompondre fàcilment en àcids grassos i glicerina. A més, amb un processat addicional es poden obtenir sabons, cosmètics o plàstics. Tot i que, el principal ús de llards no comestibles per humans és com a additiu d'alt poder energètic per pinsos del bestiar. Pel que fa als llards comestibles, s'utilitzen per la formació de *shortenings* i per productes carnis emulsionats (Ockerman i Hansen, 1994).

### **1.3. Òrgans i glàndules**

Els òrgans i les glàndules recuperades d'animals sacrificats són un grup d'aliments molt atractius pel seu alt valor nutricional, i també ofereixen una àmplia varietat de gustos i textures (Spooncer, 1988).

Les glàndules són òrgans que s'encarreguen d'elaborar i segregar substàncies necessàries pel funcionament de l'organisme com és el cas de les hormones. Es distingeixen les glàndules endocrines, que produeixen substàncies que van directament a la sang, com per exemple la tiroides, i les glàndules exocrines, que produeixen substàncies que van a

l'exterior de l'organisme a través d'uns conductes com és el cas de la suor i les llàgrimes. Les glàndules representen un pes molt petit respecte al pes total de l'animal, però són molt importants per a la indústria alimentària. El timus, els testicles i les glàndules salivals de porcs són les més utilitzades pel consum humà (Movilla, 2012).

Els òrgans i les glàndules són molt consumits per tot el món. De fet, es consideren com a productes "delicatessen" o bé com a material per llençar. Bàsicament, l'ús i valor econòmic que se'ls hi atribueix a aquests subproductes carnis comestibles depèn completament de la cultura i del país en qüestió (Rahman, 2014), ja que les propietats organolèptiques dels òrgans comestibles no són acceptades universalment. A la part del sud est d'Àsia és on els òrgans són més consumits i tenen un valor equiparable a la carn (Spooncer, 1988). En canvi, a Europa i als Estats Units el consum d'òrgans és limitat degut a la cultura culinària i pel seu alt contingut de colesterol. Es coneix que alguns òrgans comestibles, com són el cervell, cor, pulmons, fetge i ronyons (en aquest conjunt no s'hi inclou la melsa) tenen entre 3 i 5 vegades el nivell més alt de colesterol (260 - 410 mg/100 g) que comparat amb el de la carn. A més, aquests subproductes comestibles també contenen altes quantitats de fosfolípids i poden patir una possible acumulació de residus provinents de fàrmacs i metalls pesants tòxics i, per aquestes raons, el departament de sanitat d'Estats Units aconsella que el consum d'òrgans comestible sigui limitat (Rahman, 2014).

Malgrat aquesta limitació, els òrgans i glàndules comestibles també es poden utilitzar per la fabricació de medicaments, no només per menjar. Un alt nivell de colesterol és beneficiós per la indústria cosmètica, ja que aquest és molt utilitzat com a emulgent en aquest sector. Aquests productes també són apreciats per contenir alguns aminoàcids essencials, àcids grassos, vitamines, hormones i sals minerals.

Els òrgans i glàndules admesos a Espanya pel consum humà, segons el Real decret número 854 de l'any 2004, són el cervell, els ronyons, els pulmons, els intestins, la melsa, el fetge, el pàncreas, els testicles i el braguer. Dels esmentats, l'òrgan més valuós és el fetge, que a diferència dels altres, té una quantitat considerable de carbohidrats a la seva composició. En general, el perfil d'aminoàcids dels òrgans és molt més divers que la carn, ja que la presència de teixit connectiu és molt més elevada i aquests productes tenen quantitat significant d'hidroxiprolina, prolina i traces de tirosina i triptòfan (Rahman, 2014).

### **1.3.1. Característiques i utilitat dels principals òrgans i glàndules**

Els òrgans i glàndules que generalment s'utilitzen per a l'alimentació humana tenen una gran varietat de teixits a diferència de la carn i, bàsicament, l'estructura d'aquests òrgans comestibles influeix directament en les possibilitats d'ús d'aquests productes. Seguidament s'expliquen una mica les característiques i usos de cadascun.

#### **1.3.1.1. Cervell**

A diferència de molts altres òrgans, el teixit cerebral no té una estructura de teixit connectiu que faci de suport al parènquima, és a dir, que el teixit cerebral és molt sensible ja que no té cap barrera per protegir el parènquima. La integritat estructural del teixit nerviós és mantinguda a través de les cèl·lules neurogials les quals envolten les neurones, i aquesta manca de fibres al teixit connectiu probablement és causada per la tova i delicada textura del cervell. Al ser tou, el teixit cerebral és més susceptible a patir danys durant l'extracció i maneig. A més, la naturalesa d'aquest teixit també és susceptible a la colonització bacteriana i, per tant, l'extracció d'aquest òrgan s'ha de fer amb cura per evitar-li danys físics i contaminació microbiològica.

Els cervells normalment són preparats pel consum directe més que no pas per aliments processats degut a la seva textura poc consistent (Spooncer, 1988). Segons l'estudi de Jayathilakan *et al.* (2012) els cervells s'emmagatzemen sencers en refrigeració i s'utilitzen com a ingredients per salsitxes i es fan fregits, rostits, estofats i bullits.

#### **1.3.1.2. Cor**

El cor està format pel miocardi associat amb greix i amb venes i artèries externes. El miocardi consisteix en múscul cardíac amb teixit connectiu. El teixit del cor es considera força dur. Aquesta duresa es deu a la naturalesa del múscul cardíac (Spooncer, 1988).

Segons Jayathilakan *et al.* (2012), els cors s'emmagatzemen sencers o tallats en congelació o refrigeració i s'utilitzen com a ingredients per hamburgueses, pernills cuits i carn en llauna. I a més, també es solen fer en estofats.

### **1.3.1.3. Ronyons**

Tant la medul·la com el còrtex dels ronyons consisteixen en gran part en túbuls renals, i amb venes i artèries petites. L'estructura dels ronyons està feta de cèl·lules epitelials i endotelials d'aquests vasos sanguinis. També s'hi troba una malla de teixit connectiu que suporta els túbuls i els vasos sanguinis, però la quantitat de teixit connectiu és relativament petita al còrtex i s'incrementa a la medul·la cap a la pelvis renal.

Els ronyons estan situats entre els músculs del llom i el peritoneu, i aquests romanen a la canal quan les vísceres són extretes. Hi ha una càpsula adiposa al voltant dels ronyons i una capa de fàscia renal que envolta aquesta càpsula adiposa. Aquesta capa de fàscia renal està unida al peritoneu i al múscul del llom, subjectant els ronyons en aquest punt. Per extreure els ronyons, primer s'ha d'obrir la càpsula adiposa i separar-la de la fàscia renal. Llavors, quan s'extreuen els ronyons, aquests estan envoltats per una càpsula de teixit connectiu que es treu just abans del moment de coure'ls. En general, els ronyons són utilitzats sencers o tallats i es fan servir per estofats, a la brasa, bullits i en sopes, però no es solen utilitzar en productes carnis processats (Spooncer, 1988).

### **1.3.1.4. Fetge**

El fetge està compost per cèl·lules uniformes, amb una xarxa de vasos sanguinis i línies de sinusoides epitelials entre les fileres de les cèl·lules. Aquestes cèl·lules estan ordenades en lòbuls poligonals que són sostinguts pel teixit connectiu. El fetge està unit a la paret abdominal i al diafragma a través de lligaments, i a l'estómac per l'oment inferior. Aquestes unions s'han de tallar en el moment de l'extracció del fetge, i quan es duu a terme aquest procés, la vesícula biliar roman lligada als conductes hepàtics i al teixit connectiu. Llavors, la vesícula biliar es separa del fetge evitant-ne el vessament i es llença, ja que es considera una despulla (Spooncer, 1988).

Segons l'estudi de Jayathilakan *et al.* (2012) el fetge és l'òrgan comestible més valuós i s'utilitza en diferents tipus de productes carnis processats. Aquests són adequats per ingredients en salsitxes i patés perquè proporciona el gust desitjat i poder emulgent. A part, també s'emmagatzema en congelació o en refrigeració i es sol coure a la brasa, guisat i fregit.

#### **1.3.1.5. Pulmons**

El teixit pulmonar consisteix en un revestiment epitelial dels alvèols, i un revestiment endotelial dels capil·lars que envolten als alvèols, cadascun mantingut per una membrana. De fet, els separa una petita quantitat de teixit connectiu. Els bronquis es ramifiquen al teixit pulmonar i formen una xarxa de tubs de múscul llis que romanen de forma tubular gràcies a l'estructura cartilaginosa que els caracteritza (Spooncer, 1988).

Els pulmons s'emmagatzemen en congelació o en refrigeració i s'utilitzen per a preparats de sang i alimentació animal (Jayathilakan *et al.*, 2012). En canvi, Spooncer (1988) diu que els pulmons s'utilitzen com a farcit, es destinen com a ingredients per algun tipus de salsitxes, i també s'utilitzen com a ingredients per estofats.

#### **1.3.1.6. Estómac**

L'estómac dels monogàstrics està format principalment per múscul llis i teixit connectiu de col·lagen. La part interna d'aquest òrgan té una capa gruixuda epitelial, amb múscul llis i teixit connectiu que formen una paret recoberta d'una membrana mucosa de queratina.

Segons Jayathilakan *et al.* (2012), l'estómac s'emmagatzema en refrigeració i en salmorra i s'utilitza com a ingredient de salsitxes i mortadelles (sobretot a Itàlia) i en diferents carns processades. A part també es cou guisat i fumat majoritàriament. Tot i que als països asiàtics també és molt comuna la sopa d'estómac de porc.

#### **1.3.1.7. Testicles**

El teixit principal dels testicles recobreix els túbuls seminífers amb teixit epitelial i hi ha una petita quantitat de teixit connectiu que divideix els túbuls en lòbuls. De fet, els testicles estan completament tancats en una càpsula de teixit connectiu fibrós. Per l'alimentació humana són preferibles els testicles d'animals joves i el seu ús és purament culinari. Es couen saltejats o fregits (Spooncer, 1988).

#### **1.3.1.8. Timus**

El timus està recobert per una càpsula de teixit connectiu fibrós que penetra a la glàndula i la divideix en dos lòbuls. Cada lòbul té un còrtex i medul·la diferent. El còrtex està ple de limfòcits i la medul·la també, però no amb tanta quantitat i hi ha més teixit connectiu fibrós.

El timus es divideix en dos parts, la part cervical del timus que s'expandeix a ambdós costats de la tràquea, i la part toràcica.

Aquestes glàndules només es troben a animals joves, ja que a mesura que l'animal es va envellint, la glàndula es va convertint en una massa de teixit connectiu i greix. Pel que fa al consum, normalment són tallades i preparades per saltejar i fregir (Spooncer, 1988).

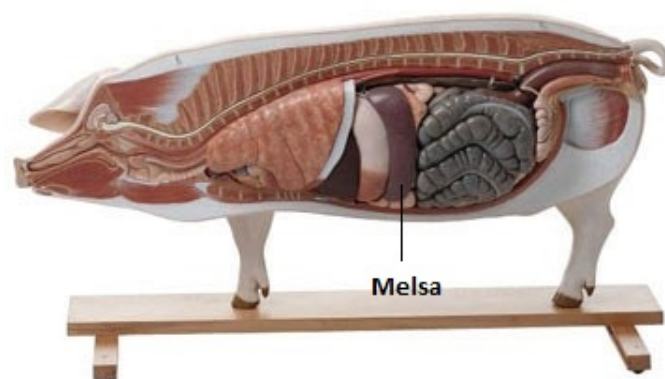
### **1.3.1.9. Llengua**

La llengua consisteix en un nucli de teixit connectiu i múscul coberts per una membrana de mucosa epitelial. Moltes vegades en l'extracció de la llengua a l'escorxadador va junt de múscul i glàndules salivals (Spooncer, 1988). Tot i això, no està molt clar si la llengua es considera glàndula, òrgan o múscul.

La llengua s'emmagatzema com a peça sencera en refrigeració o congelació i s'utilitza com a ingredient en salsitxes. Tot i que, també té ús culinari, i es sol coure fregida o en guisats (Jayathilakan *et al.*, 2012).

## **1.4. Melsa**

La melsa és un òrgan associat al sistema limfàtic que està localitzat al costat esquerre del sistema digestiu en el porc (Figura 1.2). Aquesta, té forma allargada i aplanada, coloració vermellova fosca i aspecte granulós degut a la prominència dels corpuscles esplènics.



**Figura 1.2.** Localització de la melsa en el porc (<http://www.medical-simulator.com/index.asp?idFamilia=277&idFamiliaPadre=138>).

Presenta una cara parietal (adaptada a la paret abdominal) i una cara medial on s'observa el recorregut de l'hílum que va de l'extrem dorsal a l'extrem ventral (Figura 1.3). Des de l'hílum es desprèn el lligament gastroesplènic que fixa l'òrgan a la curvatura major de l'estómac. Els nòduls limfàtics esplènics es troben a l'extremitat dorsal de l'hílum i reben aferències de la pròpia melsa, part de l'estómac, pàncreas i l'oment major (Gil *et al.*).



**Figura 1.3.** Cara parietal i cara medial de la melsa de porc  
(<http://www.teeuwissen.nl/en/productdetails/99296/Pork%20Spleen>).

La melsa es separa en l'estroma (format per teixit connectiu, fibres reticulars i fibroblasts) i el parènquima, del qual es distingeix la polpa vermella i la polpa blanca (Megías *et al.*, 2015).

#### a) Estroma:

Externament la melsa està rodejada per una capa de teixit connectiu fibrós dens, fibres elàstiques, i múscul llis denominada càpsula. La part més externa de la càpsula està recoberta per mesoteli (Megías *et al.*, 2015) que és part del peritoneu general, i engruixida per l'híi, on s'uneixen els lligaments peritoneals i per on entren les venes, les artèries i els nervis. A la vegada, surten les venes i vasos limfàtics. El gruix total i la quantitat de múscul llis varia en funció de l'espècie, i en el cas dels porcs la càpsula mostra un gruix moderat i són molt abundants les fibres musculars llises que es disposen formant una xarxa tridimensional (Bautista *et al.*, 1994).

De la càpsula més externa parteixen trabècules constituïdes per fibroblasts, fibres de col·lagen, un major nombre de fibres elàstiques que les pròpies existents a la càpsula i quantitats variables de fibres musculars llises. Les fibres de col·lagen de la càpsula i de les trabècules continuen amb una xarxa de fibres reticulars. En associació amb aquestes fibres es troben les cèl·lules reticulars que constitueixen, junt a les fibres reticulars que sintetitzen, el bastiment de la melsa. A més, es caracteritzen per contenir al seu citoplasma gran

quantitat de filaments intermedis de vimentina, i bandes de filaments similars a l'actina fins la base de la seva prolongació (Bautista *et al.*, 1994).

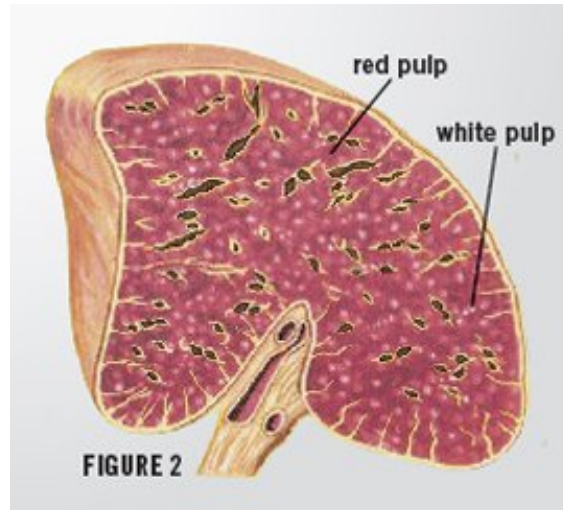
b) Parènquima:

Es distingeixen dos compartiments morfològicament i funcionalment diferents, segons Megías *et al.* (2015), com són la polpa esplènica blanca, constituïda per les beines limfoides periarterials i els fol·licles limfoides, i la polpa esplènica vermella, constituïda pels cordons esplènics, els sinus venosos i els capil·lars de les beines (Figura 1.4). Ara bé, segons Bautista *et al.* (1994), també hi ha un tercer compartiment denominat zona marginal, que és una àrea de transició entre la polpa blanca i la vermella. Les cèl·lules reticulars, limfòcits i macròfags són elements comuns en tots tres compartiments.

La polpa blanca està formada per teixit limfàtic distribuït per tota la melsa, principalment per limfòcits, macròfags i cèl·lules plasmàtiques, que es disposen al voltant de branques de l'artèria esplènica, anomenades artèries centrals. Es poden distingir dos compartiments: les beines periarterials limfoides i els fol·licles, i la seva missió principal és produir i diferenciar limfòcits, ja que la melsa és el reservori principal de limfòcits, contenint  $\frac{1}{4}$  del total de limfòcits que hi ha al cos. Concretament, el porc és una de les espècies domèstiques que conté més fol·licles limfoides i beines limfoides periarterials.

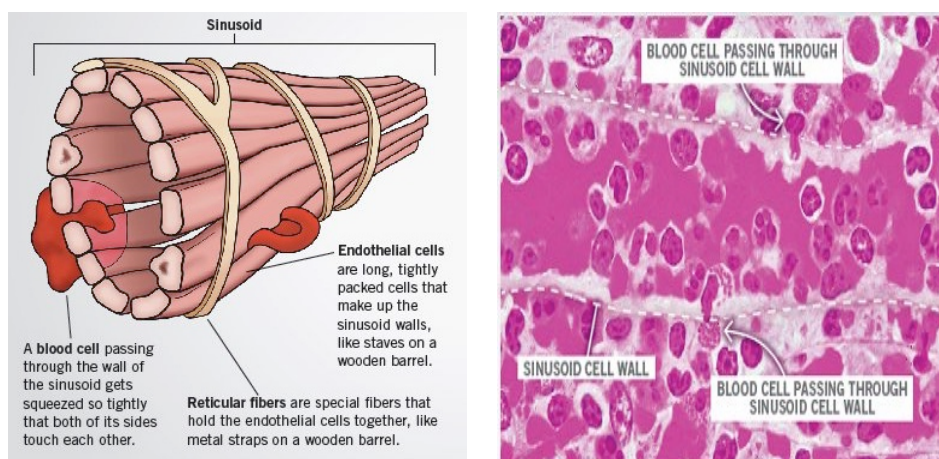
La polpa vermella s'encarrega de filtrar la sang, ja que és una xarxa densa de sinus venosos plens de sang, d'aquí s'explica la seva coloració vermellosa, així com cordons de teixit esplènic, anomenats cordons esplènics de la polpa vermella o de Billroth, entre els que es disposen els macròfags, cèl·lules reticulars i nombrosos limfòcits. Els cordons esplènics estan formats per cèl·lules i fibres reticulars, i macròfags. Les cèl·lules reticulars es consideren com miofibroblasts i poden participar en la contracció de la melsa. Entre els cordons esplènics es troben els glòbuls vermells, granulòcits i monòcits. Tot i que, també es poden trobar limfòcits i cèl·lules hematopoètiques. A la polpa vermella els macròfags s'encarreguen de destruir eritròcits i plaquetes en mal estat, així com material estrany. A part, aquest compartiment també és un punt d'emmagatzematge de ferro, eritròcits i plaquetes.





**Figura 1.4.** Distribució de la polpa vermella i blanca de la melsa.

La funció principal de la melsa és l'emmagatzematge de cèl·lules sanguínies i plaquetes. Però una altra funció que es duu a terme a la polpa vermella és la filtració de la sang. La melsa filtra a través dels sinusoides els microorganismes i partícules estranyes que han entrat al sistema sanguini. A més, també elimina les cèl·lules sanguínies defectuoses. Els sinusoides són de fet cèl·lules elongades i estan disposades com a un bota de vi de fusta, i les fibres reticulars sostenen aquests cèl·lules elongades (Figura 1.5). Així, les cèl·lules sanguínies passen entremig de les parets sinusoides i, si aquestes tenen alguna anomalia, són apartades de la circulació i eliminades pels macròfags. No obstant, el ferro de l'hemoglobina d'aquestes cèl·lules és reciclat per formar noves cèl·lules sanguínies.



**Figura 1.5.** La figura de l'esquerra mostra un sinusoid i la figura de la dreta mostra la fotografia de la secció longitudinal d'un sinusoid (Menton, 2011).

Per aquesta raó, en el cas dels humans, la melsa s'ha d'extreure a les persones que pateixin anèmia de cèl·lules falciformes per por que aquesta destrueixi totes les cèl·lules sanguínies afectades per aquest trastorn hereditari dels glòbuls vermells. Quan s'extreu la melsa d'aquests pacients, el fetge s'ocupa de les funcions de la melsa (Menton, 2011), malgrat que aquesta persona crearà menys defenses i s'evita l'extracció sempre que es pot. En porcs i animals domèstics en general, no es fa aquest tipus d'operació degut al cost que suposa i al menor rendiment final que es podria treure d'aquell animal malalt.

Una altra funció molt important de la melsa que es duu a terme a la polpa blanca, consisteix a l'acció dels limfòcits i cèl·lules plasmàtiques que protegeixen el cos d'infeccions procedents de microorganismes, cèl·lules estranyes i d'antígens. La polpa blanca és rica en limfòcits B i limfòcits T, de mode que qualsevol antigen pot ser descobert a la sang i els limfòcits B es "converteixen" en cèl·lules plasmàtiques que fan i alliberen anticossos a la sang per destruir els antígens. Llavors actuen els limfòcits T, que saben distingir les proteïnes del propi cos enfront de les anòmales i les destrueixen mitjançant un procés anomenat immunitat cel·lular mediat per aquest tipus de limfòcits (Menton, 2011).

Pel que fa a les possibles aplicacions i usos de la melsa, aquesta es sol utilitzar en carns picades i com a farciment de carns processades (Spooncer, 1988). A més, hi ha un plat tradicional a Itàlia anomenat "*Pani ca meusa*" que consta de pa amb melsa fregida (Toldrà *et al.*, 2012), i també, a Anglaterra hi ha un xef força reconegut, Fergus Henderson, que es caracteritza per fer plats on l'element principal són òrgans. En aquest cas, va fer una recepta a partir de la melsa denominada *Rolled Pig's Spleen* (Figura 1.6) que ha tingut molt bona acceptació dels consumidors on es sorprenen pel gust, ja que esperaven un gust més fort i el troben més suau que el del fetge, i remarquen la bona textura que adopta a la cocció i el preu de venda assequible del producte (The Offal Club, 2012). Així mateix, la novetat d'innovar plats a partir d'òrgans va arribar als Estats Units on també han creat alguns plats (Nose To Tail At Home, 2008, i Trippy Food, 2012).



**Figures 1.6.** El plat *Rolled Pig's Spleen* dissenyat per Fergus Henderson. A la figura de l'esquerra la melsa encara s'ha de coure (The Offal Club, 2012).

### **1.5. Possibilitats d'obtenció de proteïnes amb valor nutricional i/o propietats tecnofuncionals a partir de la melsa**

El component majoritari de la melsa és la proteïna. Segons Pearson i Dutson (1988) i Seong *et al.* (2014) conté al voltant d'un 17 % de proteïna. Aquest alt contingut en proteïna fa pensar que pot ser una bona font de proteïna d'origen animal provinent d'un material avui per avui de poc valor comercial. Des del punt de vista nutricional, al tractar-se de proteïnes animals, tenen un alt valor biològic, similars als de la carn i als de la sang (Toldrà *et al.*, 2012).

Per iniciar qualsevol procés d'obtenció de proteïnes, inicialment, s'han de rentar les melses i picar-les o triturar-les amb l'objectiu d'obtenir un homogeneïtzat carni. A partir d'aquí, es poden seguir una sèrie de procediments diferents per aconseguir proteïnes amb valor nutricional i/o propietats tecnofuncionals.

a) Processos d'obtenció de proteïnes amb funcionalitat tecnològica:

L'homogeneïtzat carni es concentra i es purifica mitjançant una filtració, o bé, una filtració per membrana com la microfiltració o la ultrafiltració. Llavors, hi ha l'opció de fer un asseccament i obtenir la proteïna en pols (Selmane *et al.*, 2008), o bé, fer una congelació d'aquest producte assecat prèvia addició de sacarosa o sorbitol, i polifosfats, donar la forma desitjada al producte, i així, obtenir un producte anomenat *surimi meat* (Ohshima *et al.*, 1993). A partir d'aquests processos es pot obtenir una proteïna amb propietats emulsionant, texturitzant, gelificant i escumant.

b) Proteïnes hidrolitzades:

Es fa una hidròlisi de l'homogeneïtzat carni amb enzims proteolítics i s'obtenen proteïnes hidrolitzades, de les quals es poden distingir pèptids de diferents mides i aminoàcids lliures. Seria interessant fer un aminograma per saber quins aminoàcids hi ha presents a la melsa. Llavors, aquests es concentren i es purifiquen per evaporadors o per membranes i s'assequen per tal d'obtenir el producte final en pols. A partir d'aquests processos es pot obtenir una proteïna emulsionant i escumant.

c) Digestió:

Es fa una digestió de l'homogeneïtzat carni per obtenir farina de carn. En aquests cas, degut a les altes temperatures que es porta a terme el procés, la proteïna es desnatura i només s'obté el producte com a ingredient nutricional per alimentació animal.

## 2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquest projecte és estudiar si la composició química i les propietats de la melsa de porc permeten revaloritzar aquest subproducte com a font de nutrients i/o com a ingredient tecnofuncional amb aplicacions potencials a la indústria alimentària.

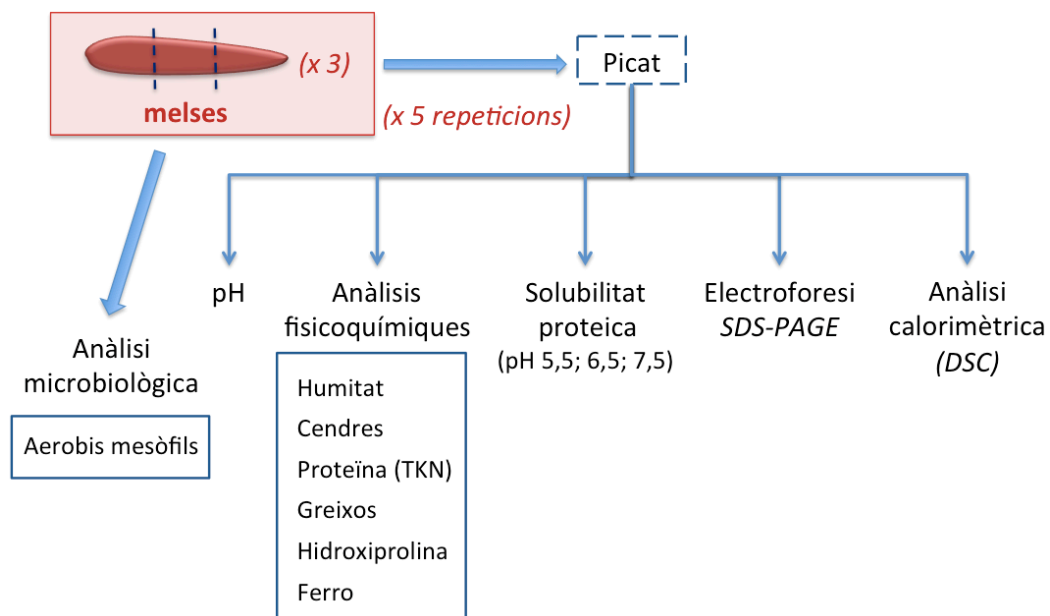
Amb aquesta finalitat es van plantejar els objectius específics següents:

1. Determinar la contaminació microbiològica general de les melses procedents d'escorxador (recomptes de bacteris aeròbics mesòfils).
2. Realitzar la caracterització fisicoquímica de les melses.
3. Realitzar una caracterització de les proteïnes presents a les melses:
  - a) Determinar la solubilitat proteica de les melses en funció del pH.
  - b) Obtenir el perfil electroforètic de les proteïnes presents a les melses mitjançant electroforesi SDS-PAGE.
  - c) Estudiar algunes propietats calorimètriques de les proteïnes a través de calorimetria diferencial de rastreig (DSC).

### 3. MATERIAL I MÈTODES

#### 3.1. Disseny experimental

Per assolir els objectius del treball, es van dur a terme els experiments que es descriuen a continuació sobre 5 mostres diferents de melses de porc, recollides en diferents dies però en les mateixes condicions (n=5). A la Figura 3.1 es mostra l'esquema del disseny experimental que es va seguir en el treball.



**Figura 3.1.** Esquema del procediment experimental dut a terme en el treball.

Per disminuir la possible variabilitat entre les mostres de melses, cadascuna de les cinc repeticions constava de tres melses de porc procedents d'un escorxador industrial (3 melses x 5 repeticions). Les melses es pesaven per separat i es dividien en tres parts iguals. La mostra a analitzar estava formada per tres parts, cadascuna d'elles d'una melsa diferent, així, s'homogeneïtzava al màxim la mostra abans del picat.

Per les anàlisis microbiològiques no es partia de la mostra homogeneïtzada, sinó que s'agafava una alíquota de cadascuna de les tres melses fresques abans del picat i en condicions estèrils.

A partir de les mostres picades, es determinava el pH i es realitzaven les anàlisis fisicoquímiques pertinents com: humitat, cendres, proteïna, greixos, hidroxiprolina i el ferro.

També es determinava la solubilitat proteica (a pH 5.5; 6.5 i 7.5), el perfil electroforètic de les proteïnes mitjançant electroforesi SDS-PAGE. Finalment, es va fer una anàlisi calorimètrica de les proteïnes a través de Calorimetria Diferencial d'Escaneig (DSC).

### 3.2. Procedència de les mostres

Les melses procedien refrigerades de l'escorxador Frigoríficos del Nordeste, S.A. (NORFRISA), a Riudellots de la Selva (Gironès), recollides el mateix dia del sacrifici de porcs aptes pel consum i es transportaven en refrigeració fins al laboratori on es procedia a fer la part experimental.

El primer pas va ser pesar les melses per saber quina variació de pesos podríem observar i es van obtenir els següents valors:

**Taula 3.1.** Registre de pesos de les melses a l'arribada al laboratori. Es mostren els valors del pes de cada repetició formada per 3 melses i la mitjana  $\pm$  desviació estàndard (n=3).

Mostra	Pes (g)	
1	190.20	219.53 $\pm$ 32.83
	255.00	
	213.40	
2	205.60	248.60 $\pm$ 39.35
	282.80	
	257.40	
3	187.00	193.83 $\pm$ 13.97
	184.60	
	209.90	
4	214.40	208.33 $\pm$ 6.92
	209.80	
	200.80	
5	192.36	201.96 $\pm$ 13.72
	195.85	
	217.67	

El pes mitjà de les melses analitzades en aquest treball és de 214.45  $\pm$  21.28 g. Segons Ockerman i Hansen (1994) el pes de la melsa de porc es situa entre 80 i 350 grams.

### 3.3. Preparació de la mostra

Les melses es van polir amb l'ajuda d'un bisturí eliminant el greix, l'artèria i la vena esplènica que segueixen tot l'hílum (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Melsa procedent de l'escorxador.

Llavors, es tallaven tres trossos iguals de les tres melses del dia (contant com a una mostra) i es trituraven en una picadora de ganivetes (Moulinex Moulinette MR). Les mostres picades s'emmagatzemaven en congelació (a  $-21^{\circ}\text{C}$ ) fins que eren analitzades.

### 3.4. Anàlisi microbiològica

Per conèixer la contaminació microbiològica general de les melses utilitzades en aquest estudi es va realitzar el recompte dels microorganismes aeròbics mesòfils totals.

El recompte de bacteris mesòfils permet conèixer la qualitat higiènica dels aliments (Rius *et al.*, 2006). L'objectiu del recompte d'aerobis mesòfils és fer una estimació de la microbiota bacteriana mesòfila, sense especificar quins tipus de bacteris hi ha la mostra. Aquesta anàlisi té un valor limitat com a indicador de la presència d'agents patògens o de les seves toxines. Un recompte de bacteris aerobis mesòfils baix no assegura que la mostra no estigui contaminada amb patògens; un recompte total alt tampoc significa, inevitablement, la presència de microbiota patògena (Rius *et al.*, 2006). Un recompte elevat de bacteris mesòfils en un aliment pot ser degut a diferents causes i pot tenir diferents significats:

- Primeres matèries excessivament contaminades.
- Manipulació incorrecta durant l'elaboració de l'aliment.



- Condicions inadequades de temps i/o temperatura durant l'emmagatzematge.
- Possibilitat que hi pugui haver bacteris patògens, ja que els bacteris transmesos pels aliments solen ser mesòfils.
- Indicació d'una alteració immediata de l'aliment.

Les mostres es recollien en recipients estèrils i es guardaven en refrigeració fins que es feien les anàlisis. Aquestes es feien en una cabina de flux laminar Telstar BV-100 (Telstar S.A., Terrassa, Espanya) prèviament esterilitzada. Es pesaven 10 g de mostra de melses que s'homogeneïtzaven amb 90 mL d'aigua de triptona (Oxoid Ltd. Basingtoke, Regne Unit) en un homogeneïtzador de pales *Stomacher Masticator* (IUL Instruments, Barcelona, Espanya) i, a continuació, es feia el banc de dilucions pertinent i la sembra en massa en el medi de cultiu de recompte general PCA (*Plate Count Agar*) (Oxoid Ltd. Basingtoke, Regne Unit). Les plaques s'incubaven a l'estufa (JP Selecta S.A., Abrera, Espanya) a  $30 \pm 1$  °C durant 48-72 hores. Després de la incubació es feia el recompte de les plaques que presentaven entre 30 i 300 colònies i els resultats s'expressaven com els  $\log_{10}$  de les ufc/g.

### **3.5. Determinació del pH**

El pH es va determinar amb l'ajuda d'una sonda de sòlids (GLP 22 Crison, Barcelona, Espanya) on es mesura el potencial que es desenvolupa a través de la membrana de vidre que separa dues solucions amb diferent concentració de protons. Les mesures del pH es feien sobre les mostres de melsa picada.

### **3.6. Caracterització fisicoquímica**

#### **3.6.1. Humitat**

L'objectiu és determinar el contingut d'aigua de la mostra. A l'hora de determinar el contingut d'aigua de la mostra és important tenir en compte que no es determina el valor total d'aigua, ja que hi ha una petita proporció variable d'aigua que es troba lligada a la matriu de la mostra i que no és determinable per aquest mètode (Guardiola *et al.*, 2007).

En aquest cas, es va utilitzar el mètode més comú per aquest paràmetre que és la dessecació. Aquesta determinació és un mètode indirecte que mesura el residu o la matèria

seca que s'obté després de l'eliminació de l'aigua per calefacció de la mostra fins a pes constant (Guardiola *et al.*,2007).

El contingut en humitat de la mostra es va determinar per gravimetria seguint el mètode oficial (AOAC, 1980). Es pesaven entre 0.5 i 1 g de mostra en un gresol de vidre amb sorra de mar i es barrejaven amb l'ajuda d'una vareta de vidre que facilitava la disgregació de la mostra. Posteriorment, el gresol amb la mostra, la sorra i la vareta es posaven a l'estufa a  $102 \pm 2$  °C (JP Selecta Conterm, Abrera, Espanya) durant 24 hores per dessecar la mostra fins a pes constant. Cada mostra es va analitzar per duplicat.

### **3.6.2. Cendres**

Les cendres es defineixen com el residu inorgànic que queda després de la incineració completa de la matèria orgànica, és a dir, equival a la part mineral de la mostra. Tot i que la seva composició varia segons la naturalesa de l'aliment i els mètodes d'incineració. Els seus components principals són el potassi, el sodi, el calci, el magnesi, el manganès i el ferro que es troben en forma d'òxid, carbonat, sulfat, fosfats, silicat i clorurs. El valor i presència d'aquests elements pot variar, ja que moltes vegades el seu valor final depèn de factors externs com la contaminació ambiental i la seva presència en aigües. (Guardiola *et al.*, 2007).

El contingut de cendres es va determinar gravimètricament segons el mètode de l'AOAC (1980). Es pesaven entre 0.5 i 1 g de mostra en un gresol de porcellana i es posaven a l'estufa a  $102 \pm 2$  °C (JP Selecta Conterm, Abrera, Espanya) durant 24 hores per assecar la mostra. Passat aquest temps, es posaven a incinerar en un forn mufla (JP Selecta Naber, Japó) a 600 °C durant 24 hores fins que les cendres presentaven un coloració blanquinosa i/o grisosa. Posteriorment, es feia la determinació del percentatge de cendres i les mostres es guardaven per la determinació del contingut de ferro per absorció atòmica. Cada mostra es va analitzar per triplicat.

### **3.6.3. Proteïna (TKN)**

El contingut en proteïna es va determinar pel mètode Kjeldahl (ISO R-937; AOAC, 1980). Aquest mètode és considerat l'oficial en nombrosos països i normes internacionals per una àmplia gamma d'aliments i es fonamenta en la mineralització de la mostra, la destil·lació del nitrogen en forma d'amoniac i la valoració d'aquest mitjançant alcalimetria. El valor del

percentatge de nitrogen es multiplica per un factor que depèn del contingut relatiu de nitrogen en les proteïnes majoritàries de cada aliment per transformar-lo en percentatge de proteïna, normalment s'utilitza un factor general de 6.25 per les proteïnes animals. No obstant, el més adequat seria utilitzar factors específics per a les diferents varietats d'aliments (Codony, 2002).

Per determinar la proteïna total es pesaven entre 0.5 i 1 g de melsa i s'introduïen en tubs Kjeldahl. S'hi afegia 15 mL de d'àcid sulfúric concentrat i una pastilla catalitzadora Kjeldahl (Cu-Se) (1.5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  +2% Se) *tablets* RE (Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Espanya) per reduir el temps de digestió i augmentar el punt d'ebullició d'aquest àcid per poder treballar a més temperatura (Codony, 2002), i es digerien en un digestor Gerhardt KB20 (C. Gerhardt GmbH &Co., Königswinter, Alemanya) a temperatura elevada per convertir el nitrogen orgànic de l'aliment en sulfat d'amoni. La rampa de temperatura que es va seguir durant la digestió eren 150 °C durant 30 minuts, 270 °C durant 30 minuts i per últim 370 °C durant 90 minuts. Aquesta seria l'etapa de mineralització de la mostra.

Un cop acabada aquesta etapa es va procedir a l'etapa de destil·lació i determinació acidimètrica on les mostres es destil·laven amb el destil·lador BÜCHI K-314 (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suïssa). Primer es posaven unes gotes d'indicador vermell de metil - blau de metilè (Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Espanya) al tub Kjeldahl i es col·locava al destil·lador. Llavors comença el procés de destil·lació on s'addiciona NaOH al 40% en excés per alcalinitzar el medi i el  $\text{NH}_3$  es destil·la amb vapor calent, recollint-lo en un erlenmeyer amb 25 mL d' $\text{H}_3\text{BO}_3$  al 4% que també contenia unes gotes del mateix indicador addicionat al tub. En total es recollien uns 125 mL de destil·lat. A continuació, el contingut de l'erlenmeyer es valorava amb HCL 0.25 N i a partir dels mL d'àcid gastats es calculava el contingut total de proteïna multiplicant per un factor de 6.25 que equival a 0.16 g de nitrogen per gram de proteïna. Cada mostra es va analitzar per triplicat.

#### **3.6.4. Greixos**

Els greixos o lípids es defineixen com uns compostos que són solubles en dissolvents orgànics i insolubles en l'aigua (Herrera, 2003).

En aquest cas es van valorar els greixos mitjançant el mètode oficial Soxhlet (BOE 29-08-1979). Es pesaven entre 2.5 i 3 g de mostra en un erlenmeyer i s'afegien 100 mL d'HCl 3 N juntament amb unes quantes boles de vidre. Tot seguit, l'erlenmeyer es tapava amb un

vidre de rellotge per evitar que s'escapés mostra i es posava a digerir en una bateria de plaques, mantenint una ebullició suau durant almenys una hora. Un cop fred es filtrava amb un doble filtre, ja que si s'hagués fet en calent no s'hauria recollit tota la mostra desitjada degut al punt de fusió del greix, i el filtre es va assecar a l'estufa. Quan el filtre era sec es col·locava dins d'uns cartutxos i es posava a l'extractor SOXHLET on es recollia tot el greix en un baló, rentant l'hidrolitzat amb èter etílic, durant sis hores. El solvent s'eliminava en un rota-vapor i es deixava assecar a l'estufa. El contingut en greix es calculava per gravimetria. Cada mostra es va analitzar per duplicat.

### 3.6.5. Quantitat d'hidroxiprolina / col·lagen

La hidroxiprolina és un aminoàcid derivat de la prolina, que és característic del col·lagen i s'empra per a la seva quantificació (Clínica Universidad de Navarra, 2015). La prolina i la hidroxiprolina són els aminoàcids majoritaris a les proteïnes de col·lagen que contenen tres cadenes de polipèptids (dues cadenes  $\alpha 1$  i una cadena  $\alpha 2$ ) i, majoritàriament són components extracel·lulars del teixit connectiu com per exemple: la pell, tendons, cartílags, vasos sanguinis del sistema vascular i ossos.

L'estructura helicoïdal del col·lagen consta de la repetició de Gly-X-Y, on la prolina pot estar en la posició X i Y i la hidroxiprolina només succeeix a la posició Y. De fet, totes dues constitueixen un terç dels aminoàcids a les proteïnes de col·lagen compreses aproximadament al 30 % de les proteïnes del cos. Malgrat que la hidroxiprolina tradicionalment ha estat considerada de tenir valor nutricional poc significatiu, ara és considerada com a substrat per la síntesi de la glicina (aminoàcid essencial pels pollastres), piruvat i glucosa que és molt important per nounats i remugants (Wu *et al.*, 2011).

A partir de la quantitat d'hidroxiprolina es pot saber el contingut de col·lagen de la mostra, ja que és un factor que contribueix a la tendresa i textura de la carn (Weston *et al.*, 2002).

Per la determinació de la hidroxiprolina primer es feia una hidròlisi de la mostra en medi àcid utilitzant HCl al 18.5% i posteriorment una oxidació de la hidroxiprolina amb cloramina-T (Scharlau, Sentmenat, Espanya). El derivat format per l'oxidació es feia reaccionar amb p-dimetilaminobenzaldehyd (Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Espanya) i es determinava colorimètricament mitjançant un espectrofotòmetre (Shimatzu UV-160A, Kyoto, Japó) llegint l'absorbància a una longitud d'ona de 560 nm. El contingut en hidroxiprolina es determinava a partir de l'absorbància i es representava una recta patró amb hidroxiprolina

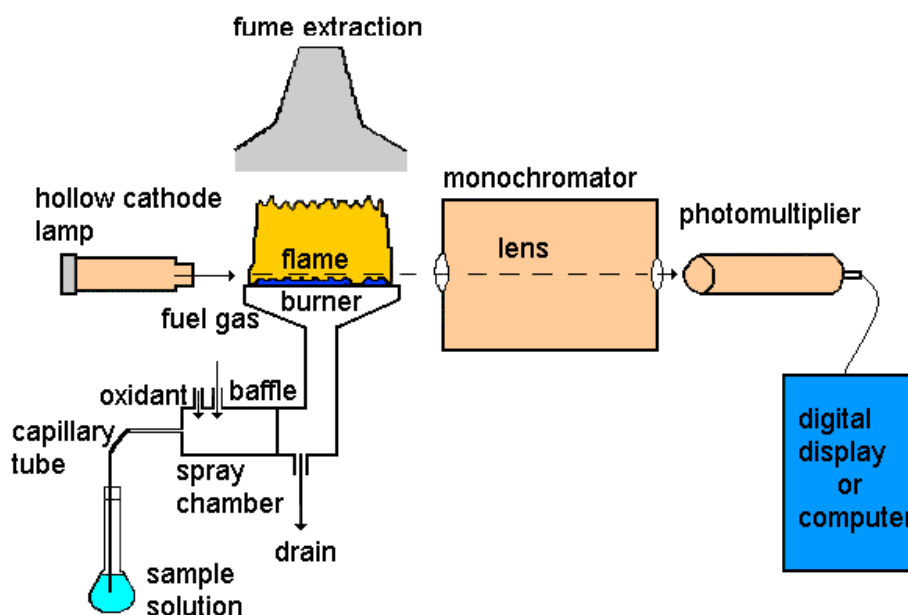
(Scharlau, Sentmenat, Espanya) en l'interval de concentracions de 5 a 20  $\mu\text{g/mL}$ . El percentatge de col·lagen es determinava multiplicant per 8 el percentatge d'hidroxiprolina. Les determinacions es feien per duplicat.

### **3.6.6. Contingut de ferro (Fe)**

A partir de les cendres, obtingudes tal com s'ha descrit a l'apartat 3.5.2, es determinava el contingut de ferro total per espectroscòpia d'absorció atòmica. La tècnica d'espectroscòpia d'absorció atòmica es basa en mesurar el valor de la radiació característica absorbida pels àtoms. A partir de l'atomització s'obtenen àtoms en estat fonamental, els quals són capaços d'absorbir la radiació electromagnètica procedent d'una font de radiacions. Normalment, la font de radiacions és una làmpada que conté un càtode de la mateixa naturalesa que l'analit que es vol analitzar. De manera que quan es subministra energia elèctrica a la làmpada, el càtode s'excita, i com a conseqüència porta tots els àtoms a un estat energètic superior. Els àtoms emeten radiacions típiques de l'element quan recuperen l'estat inicial, i aquestes absorbeixen els àtoms de la mostra. Finalment, l'absorció característica es transforma en senyals electrònics que són convertits en els valors de concentració desitjats (Bayés, 2009).

Els sistemes més comuns de vaporització són els forns de grafit i les flames, com és en aquest cas on s'utilitza l'espectroscòpia d'absorció atòmica de flama. Aquesta tècnica utilitza una làmpada de càtode buit com a font de radiacions característiques i la flama com a atomitzador. Després, quan els àtoms ja estan en l'estat fonamental mitjançant la flama, la radiació que emet la làmpada incideix a través del vapor atòmic i selectivament absorbeix els àtoms (Bayés, 2009), de manera que es pot quantificar l'element degut a l'absorció atòmica que segueix la llei de Lambert-Beer.

Els instruments necessaris són la font de radiació, el monocromador que aïlla la longitud d'ona desitjada (Bayés, 2009), el detector que detecta el senyal en el sistema electrònic i transforma aquests senyals en valors de concentració en el sistema de lectura (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Diagrama esquemàtic dels components d'un espectrofotòmetre d'absorció atòmica.

([http://www.fisica.unam.mx/liquids/atomic\\_absorption.php](http://www.fisica.unam.mx/liquids/atomic_absorption.php))

Degut a la sensibilitat de la tècnica de determinació del ferro, tot el material es rentava amb aigua àcida per evitar contaminacions i després s'esbandia amb aigua Mili-Q.

A cada gresol amb les cendres s'hi adicionaven 3 mL de  $\text{HNO}_3$  al 70%, es remenava amb cura i s'abocava a un vas de precipitats de 50 mL. Seguidament, s'afegia dues vegades 4.5 mL d'HCL concentrat al gresol, es remenava i es transferien al vas de precipitats. Als vasos de precipitats s'hi posaven unes quantes boles de vidre, es tapaven amb un vidre de rellotge i es col·locaven sobre les plaques calefactores a uns 90 °C aproximadament durant 20 minuts. S'havia de vigilar que no s'evaporés tota la mostra, de manera que quan quedava poca mostra s'afegia una mica d'aigua Mili-Q. Passats els 20 minuts, les mostres es deixaven refredar, es filtraven amb filtres Whatman nº 42 *Ashless* (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Regne Unit) i s'enrasaven a un matràs aforat de 50 mL amb aigua Mili-Q. Per determinar el Fe d'algunes mostres es va haver de preparar una dilució 1:2 per tal de poder-les llegir dins el rang de la recta de calibratge feta amb les solucions patró.

Una vegada digerides totes les mostres es determinava el contingut de Fe utilitzant un aparell SpectrAA Varian 50B Atomic Absorption Spectrometrer (Agilent Technologies, Palo Alto, California, Estats Units) (Figura 3.4), amb una làmpada multielement Varian per a Cu, Cr, Co, Fe, Ni i Mn. Les condicions d'anàlisi van ser: flama d'acetilè aire, longitud d'ona de

248.3 nm i *slit* de 0.2. Per calibrar l'aparell es feien servir solucions patró de 2.5, 5, 10 i 15 ppm de Fe, les quals es preparaven a partir d'una solució de 100 ppm preparada a partir d'una solució comercial de 1000 ppm de Fe (Panreac Química SLU, Castellar del Vallès, Espanya). Cada mostra es va analitzar per triplicat.



**Figura 3.4.** Aparell d'absorció atòmica SpectrAA Varian 50 B Atomic Absorption Spectrometer.

### 3.7. Solubilitat proteica

La solubilitat proteica és considerada com la proporció de nitrogen en un producte proteic el qual es troba en un estat soluble sota unes condicions específiques. La solubilitat és la quantitat de proteïna en una mostra que es pot dissoldre en un solvent.

És una de les tècniques més utilitzades i determinants durant el desenvolupament de nous ingredients o productes proteics. De manera, que és una propietat fisicoquímica relacionada amb altres propietats funcionals. Amb el coneixement de la solubilitat s'obté informació molt útil sobre la utilització de les proteïnes i la seva funcionalitat, especialment en escumes, emulsions i gels. La solubilitat és la principal característica de les proteïnes seleccionades pel seu ús en aliments líquids i begudes. De fet, com més alta és la solubilitat proteica més bona capacitat de dispersió de molècules s'obté i la formació de sistemes col·loïdals és més

senzilla i precisa. Aquesta és influenciada per la composició i seqüència d'aminoàcids, pes molecular, i la conformació i contingut dels grups polars i apolars dels aminoàcids; com també, de la força iònica, tipus de solvent, pH, temperatura i condicions de processament. De totes maneres, el factor més determinant a la solubilitat proteica és el pH del medi. El grau de proteïna soluble en un medi aquós és el resultat de les interaccions hidrofòbiques i càrregues electrostàtiques entre les molècules de les proteïnes, i aquesta augmenta si la repulsió de càrregues electrostàtiques entre molècules és major que les interaccions hidrofòbiques (Zayas, 1997).

Es va determinar la solubilitat de les melses a pH 5.5, 6.5 i 7.5 mitjançant la tècnica descrita per Morr *et al.* (1985) amb algunes modificacions. Es pesaven entre 5 i 10 g de mostra en un vas de precipitats alt de 50 mL i s'afegien 30 mL de la solució tampó fosfat 0,2 M de pH 5.5, 6.5 i 7.5. Llavors, les solucions s'homogeneïtzaven en un POLYTRON PT 3000 (KYNEMATICA AG, Suïssa) durant 5 minuts a 20000 rpm, s'ajustava al pH corresponent amb NaOH o HCl, i es mantenien en agitació durant 20 min. Després, les dilucions s'enrasaven a 50 mL amb el tampó fosfat corresponent a cada pH. Posteriorment, les mostres es centrifugaven a 12380 rpm (25000 x g) amb l'objectiu de separar la part soluble (sobrenedant) del pellet (part sòlida), per decantació. A l'acabar, es van agafar 10 mL del sobrenedant i es va determinar el percentatge de proteïna pel mètode Kjeldahl, tal com s'ha explicat a l'apartat 3.5.3. Cada mostra s'analitzava per duplicat. La solubilitat proteica es calculava com el percentatge de proteïna soluble respecte el percentatge de proteïna total de cada mostra.

### **3.8. Electroforesi SDS-PAGE**

L'electroforesi es defineix com la separació de macromolècules en un camp elèctric i concretament, un mètode molt comú per separar les proteïnes a través de l'electroforesi és l'anomenat electroforesi en gels de poliacrilamida i sodi dodecil sulfat (SDS-PAGE), on s'utilitza un gel discontinu com a suport del medi i sodi dodecil fosfat (SDS) per desnaturalitzar les proteïnes. El SDS és un detergent aniònic, en el qual es dissolen les molècules que tenen càrrega negativa en un rang de pH molt ampli. Una cadena polipeptídica lliga una quantitat de SDS en proporció a la seva massa molecular relativa i les càrregues negatives a l'SDS destrueixen la majoria de l'estructura complexa de les proteïnes, i són fortament atretes cap a l'ànode (càrrega elèctrica positiva) en un camp elèctric (Experimental Biosciences, 2012).



Els gels de poliacrilamida retenen la migració de les molècules de pes molecular més alt més ràpid que les de baix pes molecular i, a més, com que la proporció càrrega-massa és la mateixa entre polipèptids-SDS-desnaturalitzats, la separació final de proteïnes depèn completament de la diferència de la massa relativa de polipèptids. En un gel de densitat uniforme la distància de migració relativa ( $R_f$ ) d'una proteïna és inversament proporcional al logaritme de la seva massa. Si la massa de la proteïna coneguda corre al mateix temps que les desconegudes, la relació entre la  $R_f$  i la massa es pot representar gràficament i, llavors estimar les masses de les proteïnes desconegudes. En definitiva, la separació de proteïnes a través de SDS-PAGE es pot utilitzar per estimar la massa relativa molecular de les proteïnes, per determinar l'abundància de proteïnes més significatives a la mostra, i la distribució de proteïnes entre les fraccions (Experimental Biosciences, 2012).

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

Es van sotmetre a electroforesis SDS PAGE les fraccions solubles (sobrenedant) i insolubles (*pellet*) dels anàlisis de solubilitat de les melses a pH 5.5, 6.5 i 7.5. Les mostres es van diluir en tampó TRIS 0,01 M, SDS a l'1% (p/v), i  $\beta$ -mercaptoetanol a l'1 % (v/v), ajustat a pH 6.8 amb àcid fosfòric, a una concentració final de proteïna d'1 mg/mL. De les mostres líquides es feia una dilució 1:5 amb 1 mL de sobrenedant amb 4 mL de tampó. Pel que fa a les sòlides, es feia una dilució 1:20, amb 1 g de pellet més 19 mL de tampó TRIS-EDTA. Les mostres diluïdes es sotmetien a ebullició durant 5 minuts, es refredaven i, posteriorment, es centrifugaven a 2530 rpm (1000 x g) durant 5 minuts. Després, a cada tub s'afegien unes gotes de blau de bromofenol al 0.01% com a indicador del front de migració.

#### **b) Condicions de separació electroforètica:**

La separació electroforètica es duia a terme en un equip Multi-tasca PhastSystem<sup>TM</sup> (Pharmacia LKB Biotech AB, Uppsala, Suècia) que té un compartiment de separació amb capacitat per a dos gels (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Aparell Multi-tasca PhastSystem (Amersham Biosciences, 2004).

L'anàlisi electroforètica de les proteïnes de les melses es va realitzar en dos tipus de gels de poliàcrilamida (PA) homogenis PhastGel (GE Healthcare, Buckinghamshire, Regne Unit) de diferent densitat, concretament es van utilitzar gels de 12.5% de PA, amb un rang de lectura de pes molecular de 15 kDa a 250 kDa, i de 20% de PA, amb un rang de lectura de pes molecular de 2 kDa a 150 kDa. Els gels homogenis tenen un efecte colador constant a les proteïnes, i així, les proteïnes no arriben al "*pore-limit*" que significaria que la migració de les proteïnes seria molt més lenta. A més, a partir dels gels homogenis s'obté una millor separació (distància entre bandes) entre proteïnes en un rang de pes molecular estret (Amersham Biosciences, 1998). De manera que aquests són els gels més adequats per mostres complexes. Es denomina "*pore-limit*" al punt on la proteïna arriba al mínim rang de migració, on és constant per totes les proteïnes. És a dir, que les proteïnes migren de les regions on la concentració d'acrilamida és més elevada cap a regions de porus més petits on la seva mobilitat es veu reduïda i cadascuna arriba al seu "*pore-limit*" (National Diagnostics, 2011).

Per estimar el pes molecular de les proteïnes es van utilitzar com a patrons dos tipus de marcadors de pesos moleculars coneguts en funció de la concentració de PA dels gels.

- *Patró de pes molecular baix*: en els gels de 20 % de PA es va utilitzar el marcador PageRuler™ Low Range Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific™, Lituània), que contenen una mescla de proteïnes i pèptids de pesos moleculars de 3.4 kDa a 100 kDa. Els marcadors venien dissolts en una solució tampó i podien ser aplicats directament sobre els gels.

- *Patró de pes molecular elevat*: en els gels de 12.5 % de PA es va utilitzar el marcador BenchMark™ Protein Ladder (Life technologies™, Carlsbad, Califòrnia, Estats Units),

amb 15 bandes de proteïnes amb un rang de pes molecular de 10 kDa a 220 kDa. Aquest també venia dissolt en una solució tampó i es podia aplicar directament sobre els gels.

Els gels es van dipositar en el llit de separació, dispensant prèviament a la base uns 125 µL d'aigua destil·lada, evitant la presència de bombolles d'aire. A continuació, es posaven les tires tampó que contenen tricina 0.02 M, Tris 0.20 M i un 0.55% de SDS (pH 8.1) en contacte amb els elèctrodes. A cada gel es carregaven uns 5 µL de les mostres corresponents així com dels marcadors. Tan els gels com les tires tampó eren PhastGel™ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suècia).

Les condicions de separació electroforètica utilitzades pels gels homogenis de 12.5% i 20 % de poliacrilamida es mostren a la taula 3.2:

**Taula 3.2.** Mètodes de separació utilitzats en la SDS-PAGE pels gels homogenis de 12.5% i 20%.

	Gels homogenis de 12.5%	Gels homogenis de 20%
1) Pre-electroforesi:	Voltatge 250 V, corrent 10.0 mA, potència 3.0 W, T <sup>a</sup> 15 °C i durada 1 Vh.	Voltatge 250 V, corrent 10.0 mA, potència 3.0 W, T <sup>a</sup> 15°C i durada 1 Vh.
2) Aplicació	Voltatge 250 V, corrent 1.0 mA, potència 3.0 W, T <sup>a</sup> 15°C i durada 1 Vh.	Voltatge 250 V, corrent 1.0 mA, potència 3.0 W, T <sup>a</sup> 15°C i durada 1 Vh.
3) Separació	voltatge 250 V, corrent 10.0 mA, potència 3.0 W, T <sup>a</sup> 15°C i durada 70 Vh	Voltatge 250 V, corrent 10.0 mA, potència 3.0 W, T <sup>a</sup> 15°C i durada 99 Vh

### c) Desenvolupament dels gels:

El desenvolupament dels gels es realitzava en la cambra de desenvolupament de l'equip PhastSystem™, mitjançant una tinció amb Blau de Coomassie. Els reactius utilitzats van ser: solució de fixació (glutraldehid 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 destintat (solució al 30 % de metanol i 10 % d'àcid acètic en aigua destil·lada); i solució conservant (glicerol al 10% i àcid acètic al 10% en aigua destil·lada). El procés de tinció es duia a terme a 50°C i el temps destinat a cada etapa va ser de 4 min per la fixació, 8 min per la tinció, 33 min per el destintat, renovant la solució de rentat als 5, 13 i 23 min i 5 min per a la conservació.

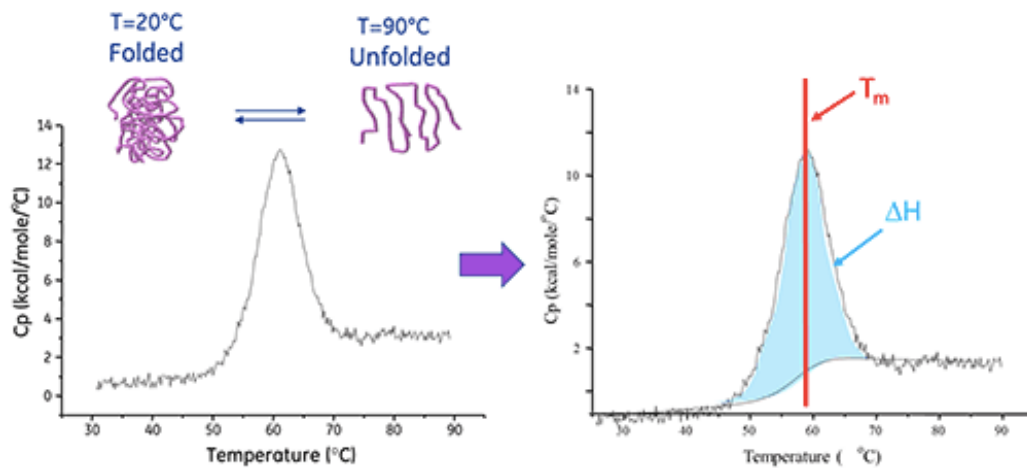
### 3.9. Anàlisi calorimètrica diferencial (DSC)

L'anàlisi calorimètrica diferencial de rastreig o escaneig (DSC -*Differential scanning calorimetry*-) és una tècnica analítica utilitzada per caracteritzar l'estabilitat de la proteïna nativa o de qualsevol altra biomolècula directament lligada amb la seva forma nativa. En aquesta tècnica es mesura el canvi de calor associat amb la desnaturalització tèrmica de la molècula quan s'escalfa a una velocitat constant (Malvern Instruments Ltd, 2016).

El DSC és la tècnica més directa i precisa per la caracterització dels paràmetres termodinàmics que controlen la formació dels enllaços no covalents, i la seva estabilitat a les proteïnes i altres macromolècules (Calorimetry Sciences Corporation, 2006).

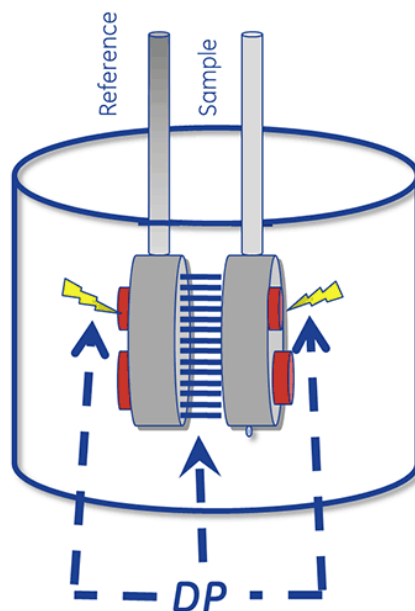
El resultat d'un experiment de DSC és una corba de flux de calor enfront de la temperatura o enfront del temps (termograma), com el que es mostra a la Figura 3.6. Les reaccions exotèrmiques de la mostra es mostren amb un pic positiu o negatiu, depenent del tipus d'experiment. Aquesta corba es pot utilitzar per calcular entalpies de les transicions. Això es realitza mitjançant la integració del pic corresponent a una transició donada. Les biomolècules estan en estat d'equilibri entre la forma nativa (plegada) i la desnaturalitzada (desplegada) quan es troben a la solució. Ara bé, el DSC mesura la variació d'entalpia ( $\Delta H$ ) de les proteïnes desplegadas a partir del tractament tèrmic induït a la desnaturalització, i també, s'utilitza per determinar el canvi del calor específica ( $\Delta C_p$ ) de la desnaturalització. Alhora, també pot influir en certs factors que ajuden a desplegar les biomolècules i, per tant, afecten a la seva estabilitat. Dins d'aquests factors s'hi inclou la formació d'interaccions hidrofòbiques, ponts d'hidrogen, l'entropia i el medi físic de la molècula. El punt de transició on la temperatura és més elevada, anomenat punt mig de la transició tèrmica ( $T_m$ ), és el punt on la molècula es troba més estable.

Les macromolècules i conjunts macromoleculars (>5000 Daltons), com les proteïnes, àcids nucleics i lípids poden formar estructures ben definides que es sotmeten a canvis de conformació deguts als tractaments tèrmics induïts. Aquesta reorganització de l'estructura dóna a lloc l'absorció de calor a través de la redistribució d'enllaços no covalents. L'anàlisi calorimètrica diferencial mesura aquesta absorció de calor.



**Figura 3.6.** Exemple de corbes obtingudes per DSC, on es mostra la desnaturalització de les proteïnes (Malvern Instruments Ltd, 2016).

El nucli termal del sistema del DSC consisteix en dues cel·les, una per la referència i l'altra per la mostra. L'aparell està dissenyat per mantenir les dues cel·les a la mateixa temperatura quan són escalfades. De manera que la cel·la de referència s'emplena amb una solució amortidora i l'altra cel·la amb la mostra que es vol analitzar. Llavors, s'escalfen a temperatura constant (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Funcionament teòric del DSC (Malvern Instruments Ltd, 2016).

L'absorció de calor succeeix quan les proteïnes desplegadas provoquen una diferència de temperatura entre les cel·les. Aquest fet produeix un voltatge que es converteix en potència i és utilitzat per controlar l'efecte Peltier produït pel gradient de temperatura entre les cel·les. Així, ambdues cel·les tornen a tenir la mateixa temperatura i a través del gràfic generat durant aquest procés s'obté el valor de l'entalpia de les proteïnes desplegadas en la unitat de calories (Ca) o Joules (J) (Malvern Instruments Ltd, 2016).

Les anàlisis DSC de les mostres de mels es van realitzar als laboratoris de la Unitat d'Anàlisi Tèrmica dels Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona.

Les anàlisis calorimètriques es van realitzar en un calorímetre DSC Q 2000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, Estats Units) (Figura 3.8), emprant gresols d'alumini tancats hermèticament a pressió mitjançant una premsa especial. Les càpsules de referència estaven buides amb la finalitat d'obtenir una línia de base recta. Les condicions de les anàlisis de DSC es van dur a terme sota un programa d'escalfament des de 20 fins a 100 °C, a una velocitat d'escalfament de 3 °C/min.



**Figura 3.8.** Calorímetre Diferencial d'Escaneig (DSC) Q 2000 de TA Instruments.

A partir dels termogrames obtinguts, es va calcular l'àrea del pic de transició endotèrmica, mitjançant integració. A partir de la utilització d'una línia de base recta, es va determinar la

variació de l'entalpia global de transició del procés de desnaturalització proteica ( $\Delta H$ ), en Joule per gram de mostra i les entalpies parcials dels processos endotèrmics. També es van obtenir les temperatures de desnaturalització proteica ( $T_d$ ) de les diferents mostres, considerant que es corresponien amb la temperatura en la qual es donava el mínim dels pics endotèrmics registrats als termogrames. Es va utilitzar el software d'anàlisi "Universal Analysis" de TA Instruments.

### **3.10. Anàlisi estadística de les dades**

L'anàlisi estadística dels resultats de la solubilitat proteica es va realitzar amb el programa SPSS versió 23 per a Windows (IBM SPSS *Statistical software* Inc., Chicago, Illinois, Estats Units). Es va dur a terme un anàlisi de la variància (ANOVA) per l'efecte del pH sobre la solubilitat. Es van 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 HSD amb un nivell de significació de  $P = 95\%$ .

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1. Experiments preliminars

En primer lloc, es van fer uns estudis preliminars que van servir per fer una primera caracterització de la composició fisicoquímica de les melses i per posar a punt algunes tècniques analítiques que s'utilitzarien en el treball com la solubilitat proteica i l'electroforesi SDS-PAGE.

Aquestes proves es van realitzar sobre melses provinents d'un establiment de venda al detall, i van ser recollides i transportades en condicions de refrigeració fins al laboratori.

El valor de pH de les mostres va ser de 6.33 unitats de pH. A partir d'aquests resultats es va decidir determinar la solubilitat proteica a tres condicions de pH diferents, en comptes de fer un sol tractament a pH 6.5 (pH més proper al de la melsa) com s'havia pensat inicialment.

També es va realitzar el recompte de microorganismes aerobis mesòfils. En aquest cas el resultat obtingut va ser de 4.1 log ufc/g.

Els resultats de la caracterització fisicoquímica de les proves preliminars es mostren a la taula 4.1.

**Taula 4.1.** Resultats de la caracterització fisicoquímica de les melses en els estudis preliminars. Es mostren valors de la mitjana  $\pm$  desviació estàndard (n=2).

<b>Paràmetre</b>	<b>(g/100 g)</b>
<b>Humitat (%)</b>	78.92 $\pm$ 0.76
<b>Cendres (%)</b>	1.11 $\pm$ 0.26
Greix (%)	No determinat
<b>Proteïna (%)</b>	18.06 $\pm$ 0.61
<b>Hidroxirolina (%)</b>	0.34 $\pm$ 0.16
<b>Col·lagen (%)</b>	2.70 $\pm$ 1.26
Ferro (ppm)	No determinat



Els resultats de la primera caracterització fisicoquímica van confirmar que el component majoritari de la melsa és la proteïna, amb la qual cosa es va plantejar que també es faria un estudi de les proteïnes mitjançant electroforesi, així com una anàlisi calorimètrica per DSC. Es van posar a punt les tècniques de determinació de la solubilitat proteica (a pH 5.5, 6.5 i 7.5), així com de l'electroforesi SDS-PAGE sobre els extractes proteics dels sobrenedants i els *pellets* obtinguts en la determinació de la solubilitat.

## 4.2. Recompte de microorganismes aerobis mesòfils

El recompte de microorganismes aerobis mesòfils totals de les mostres permet saber el grau de contaminació general de la mostra analitzada. Segons el reglament CE 2073/05, DOUE L338/1 de l'any 2005, el recompte d'aerobis mesòfils de canals porcines seria satisfactori si la mitjana logarítmica diària és inferior o igual a 4 unitats logarítmiques ufc/g. En el cas que la mitjana logarítmica diària es trobés entre 4 i 5 unitats logarítmiques ufc/g seria acceptable. Però, si aquest valor és superior a 5 unitats logarítmiques ufc/g la mostra ha de ser rebutjada i, per tant, no seria apte pel consum humà.

En el cas dels recomptes de microorganismes aerobis mesòfils de les melses realitzats en aquest treball s'ha obtingut un valor de  $4.86 \pm 0.23$  log ufc/g (mitjana  $\pm$  DE, n=5). Per tant, s'observa que els recomptes es troben dins del rang d'acceptabilitat dels criteris d'higiene de processament de productes carnis.

Si el valor obtingut hagués estat superior al límit establert, s'haurien d'haver aplicat millores en la higiene del sacrifici dels animals a l'escorxador i la revisió dels controls que es realitzen al llarg de tot el procés.

En els recomptes de microorganismes aerobis mesòfils d'altres òrgans comestibles, com per exemple el fetge, s'observa que hi ha una combinació de microbiota externa dominada per mesòfils gram positius, principalment micrococcàcies amb un recompte d'entre 3 i 5 unitats logarítmiques i de microbiota interna també dominada pels mateixos bacteris, però amb menor quantitat, ja que el recompte és de l'ordre de 2 unitats logarítmiques (Gill, 1988). Si es comparen els valors de la microbiota del fetge, que és l'òrgan més semblant a la melsa, amb els resultats obtinguts s'observa com el recompte de microbiota externa d'aquest òrgan i el recompte de la melsa són molt similars i tots dos compleixen la normativa microbiològica vigent pel consum.

### 4.3. Caracterització fisicoquímica

En la caracterització fisicoquímica de les melses d'aquest estudi es van determinar paràmetres com el pH, el contingut d'humitat, greix, cendres i proteïna. A més, també es va analitzar el contingut d'hidroxiprolina per conèixer el percentatge de col·lagen total de la mostra i el contingut de ferro a partir del residu obtingut en la incineració de les mostres per la determinació de les cendres.

El valor del pH de les melses va ser de  $6.30 \pm 0.05$  (mitjana  $\pm$  DE). Aquest resultat indica que el pH de les mostres és pràcticament neutre (entre 5 i 8), i lleugerament superior al pH normal de la carn de porc (5.6-6.2). Es considera que la majoria de microorganismes patògens creixen a un pH més aviat neutre, així que s'ha de tenir en compte aquest paràmetre i fer les anàlisis microbiològiques necessàries per comprovar que no hi ha risc de proliferació de microorganismes patògens i/o deteriorants i assegurar unes bones pràctiques d'higiene en la manipulació i el processament.

A la Taula 4.2 es mostren els resultats de la caracterització fisicoquímica de les melses de porc.

**Taula 4.2.** Resultats de la caracterització fisicoquímica de les melses de porc. Es mostren valors de la mitjana  $\pm$  desviació estàndard (n=5) i es comparen amb valors obtinguts en altres estudis.

<b>Paràmetre</b>	<b>Melses porc treball</b>	<b>Seong <i>et al.</i> (2014)</b>	<b>Pearson i Dutson (1988)</b>
<b>Humitat (%)</b>	78.85 $\pm$ 0.39	78.58 $\pm$ 0.89	78.43
<b>Cendres (%)</b>	1.34 $\pm$ 0.08	1.12 $\pm$ 0.07	-
<b>Greixos (%)</b>	2.93 $\pm$ 0.39	0.97 $\pm$ 0.21	2.59
<b>Proteïna (%)</b>	17.18 $\pm$ 0.69	17.79 $\pm$ 0.33	17.86
<b>Hidroxiprolina (%)</b>	0.20 $\pm$ 0.07	-	-
<b>Col·lagen (%)</b>	1.60 $\pm$ 0.55	-	-
<b>Ferro (ppm)</b>	319.69 $\pm$ 113	178.54 $\pm$ 27.65	223.2

Pel que fa als resultats obtinguts de les mostres analitzades es pot observar que les melses presenten quasi un 79 % d'humitat i que el principal component de l'extracte sec és la proteïna, després el greix i per acabar les sals minerals (cendres).

Comparant els resultats de les melses analitzades amb els resultats de la part experimental prèvia, els valors són força similars i, per tant, els esperats. El valor de la humitat és pràcticament idèntic i els valors de cendres i proteïna també són similars. L'única petita diferència és el contingut de proteïna i col·lagen que són un 1 % inferiors respecte els valors obtinguts en els experiments preliminars. Això es deu a que el percentatge d'hidroxiprolina en les mostres dels experiments preliminars és lleugerament més elevat i de retruc, també s'augmenta el contingut de col·lagen, ja que aquest es calcula directament multiplicant el percentatge d'hidroxiprolina per 8 i normalment, la hidroxiprolina és un 10 % del contingut de col·lagen aproximadament. El petit augment del contingut de proteïna podria ésser degut a aquest increment de la quantitat de col·lagen.

Si els resultats obtinguts en aquest treball es comparen amb els de la bibliografia consultada (Pearson i Dutson., 1988, i Seong *et al.*, 2014), s'observa com el valor de la humitat és completament idèntic. A partir d'aquí es pot concloure que aquest valor sempre serà força constant en totes les melses, i per tant, es dedueix que totes les mostres, malgrat tenir pesos diferents, són molt homogènies en la composició.

El valor de les cendres segueix una tendència similar al de la humitat. Malgrat que la mostra analitzada té un percentatge de sals minerals una mica superior respecte el valor de l'estudi de Seong *et al.* (2014), la baixa desviació estàndard d'ambdues determinacions corrobora l'homogeneïtat de les mostres i, per tant, el valor que es pugui obtenir en futurs estudis o caracteritzacions és d'esperar que sigui similar a aquests.

En el cas dels greixos es veu com el resultat obtingut es troba al voltant del 3 % de greix. A grans trets aquest resultat respecte el percentatge total de la caracterització és baix i, per tant, és un factor important des d'un punt de vista dietètic. No obstant, comparant aquest resultat amb l'estudi de Pearson i Dutson (1988), s'observa la coincidència de valors però no amb el treball de Seong *et al.* (2014), on el resultat obtingut és un 2 % inferior. Tot i que no es coneix com s'han analitzat les mostres de Seong *et al.* (2014), aquesta petita diferència pot ésser deguda a certs factors que es desconeixen de les mostres dels altres estudis, tant de la procedència de les mostres com també l'alimentació i la raça dels porcs. Degut a aquests factors pot variar molt la conformació física dels animals, l'índex de

conversió i, com a conseqüència, també que el percentatge de greix en els òrgans interns sigui més elevat o menys.

Pel que fa al resultat de proteïna, el valor de la mostra analitzada és lleugerament inferior als valors de la bibliografia consultada (Pearson i Dutson., 1988, i Seong *et al.*, 2014), però tots tres valors són de l'ordre del 17.2-17.9 %. Aquest fet també demostra l'homogeneïtat de les mostres. Tot i que en aquest cas, el valor de la desviació estàndard és més elevat respecte a les altres determinacions i indica una dispersió més elevada dels valors de les mostres.

Comparant els resultats d'aquests paràmetres de les melses porcines amb la composició d'altres òrgans, com per exemple pulmons, fetge, cor, pàncreas i ronyons, s'observa com el contingut d'humitat oscil·la entre el 70 i 80 %, essent els ronyons els que tenen el percentatge d'aigua més alt i el pàncreas el més baix. En canvi, pel que fa al contingut de greix, exceptuant el pàncreas que té un 13 % de greix, la resta d'òrgans esmentats tenen al voltant d'entre 3 i 4 % de greix (Pearson i Dutson, 1988).

Si es compara el valor de proteïna de la melsa amb el del fetge, que és l'òrgan més consumit i amb més sortida al mercat com a peça per a consumir sense processar, i alhora el més semblant a la melsa, es veu com aquest té aproximadament un 5 % més de proteïna (22 % de proteïna en total) segons Seong *et al.* (2014). Per tant, no està tan lluny d'un percentatge de proteïna òptim al ser un òrgan i coincideix amb el contingut de proteïna de la carn, que és d'entre el 15 i 20 % (Amo, 1980). Així, aquesta dada justifica l'objectiu principal de partida del present treball.

Per últim, el contingut de cendres d'aquests òrgans es troba entre el 0.7 i 1.4 %, essent el fetge el que té el percentatge més elevat i amb molt poca diferència del valor de la melsa (Seong *et al.*, 2014), que pot ser atribuïble al major contingut en ferro d'aquests òrgans.

Comparant el percentatge de col·lagen amb l'estudi de Neuman i Logan (1950), s'observa que el valor del seu treball és un 0.8% superior al de les melses estudiades. El percentatge de col·lagen indica la duresa de la carn, ja que aquesta proteïna es troba en teixits amb funció estructural. Si es valora el resultat obtingut i el de la bibliografia consultada, s'observa un valor molt baix. Així, la duresa de la melsa no la proporciona majoritàriament el col·lagen, sinó que hi ha altres proteïnes estructurals que li proporcionen aquesta textura. A més, el contingut de col·lagen també disminueix el valor biològic de les proteïnes, ja que no aporta tots els aminoàcids essencials per als éssers humans, però sí que proporciona els

aminoàcids específics de la proteïna de col·lagen necessaris perquè certes cèl·lules especialitzades del cos humà elaborin el nostre propi col·lagen. Només al voltant de l'1 % del col·lagen natiu és absorbit pel cos humà. En canvi, si el col·lagen natiu es processa en forma de gelatina se'n facilita l'assimilació.

Pel que fa al contingut de ferro, s'ha obtingut una concentració de ferro més elevada respecte les dues fonts bibliogràfiques consultades (Pearson i Dutson, 1988, i Seong *et al.*, 2014). No obstant, el resultat obtingut presenta una desviació estàndard molt alta, el que indica una alta dispersió dels valors de la concentració de ferro entre les diferents mostres estudiades. La variació de contingut en ferro pot estar relacionada amb la quantitat de sang romanent a l'interior de les melses. Si es compara el valor de les melses estudiades amb el del fetge, òrgan considerat ric en ferro (148.4 ppm segons Seong *et al.*, 2014), s'observa com els resultats dels estudis consultats i el de la mostra estudiada són superiors. De fet, la poca quantitat de melsa que s'utilitza en productes carnis quasi sempre es barreja amb altres ingredients carnis. En tot cas, el ferro incrementa el valor nutricional i pot ser apte per complementar dietes baixes en ferro. A més, cal considerar que és ferro hemínic (de l'hemoglobina de la sang), i aquest presenta una elevada biodisponibilitat (Gaitán *et al.*, 2006).

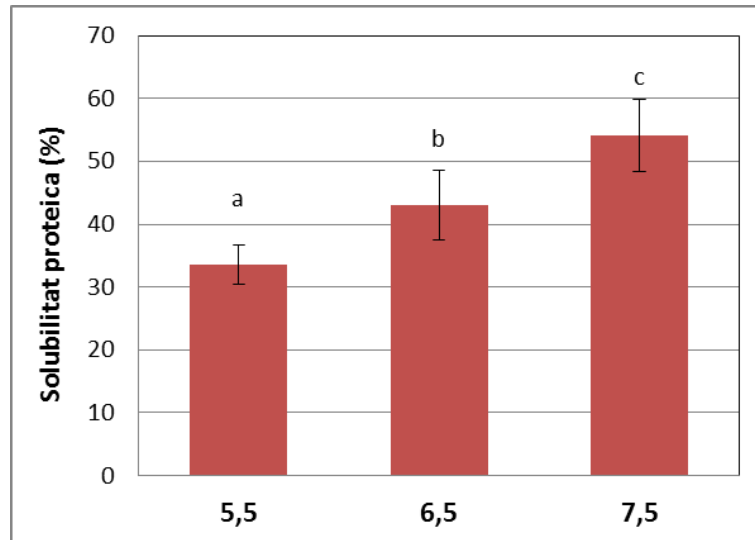
Deixant de banda el contingut de ferro i de col·lagen, la suma de de totes les determinacions (humitat, cendres, greixos i proteïna) ha de sumar 100 en la totalitat del percentatge. Així, si es procedeix a fer la suma de tots els paràmetres comparant-los amb els de la bibliografia consultada s'observa que s'obté un valor de 100.3% de la mostra analitzada i un 98.46% de l'estudi de Seong *et al.* (2014).

Val a dir, que tot i que no s'hagi determinat el contingut de sucres, segons Pearson i Dutson (1988), el contingut de sucres de la melsa és proper a zero, i pel que s'ha observat a la caracterització, aquest resultat és satisfactori, ja que el resultat final de la caracterització fisicoquímica ha estat del 100%.

#### **4.4. Solubilitat proteica**

La solubilitat proteica o índex de solubilitat, tal com s'ha explicat a l'apartat 3.7, es calcula com el quocient entre el percentatge de proteïna soluble respecte el percentatge de proteïna total de la mostra (Bourgeois i Le Roux, 1986).

A la Figura 4.1 es mostren els resultats de la solubilitat proteica dels extractes de melsa de porc en funció del pH.



**Figura 4.1.** Solubilitat proteica de les melses de porc en funció del pH. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard de les mitjanes (n=5). Les lletres diferents mostren diferències significatives per l'efecte del pH ( $P < 0,05$ ).

La solubilitat proteica de les melses porcines a les 3 condicions de pH estudiades va ser del 34 % al 54 %. Pel que fa al pH, a mida que augmenta el pH, incrementa la solubilitat proteica de la melsa.

L'anàlisi de la variància (ANOVA) va mostrar que el pH tenia un efecte significatiu ( $P < 0.05$ ) sobre la solubilitat proteica de les melses i el test de separació de mitjanes va separar els 3 grups en funció del pH (Taula 4.3 (a) i (b)).

Observant els resultats, es veu que a l'aplicar un tractament d'extracció amb un pH més elevat, augmenta la solubilitat. Aquest fenomen s'explica degut a que la solubilitat proteica depèn del pH, essent menor al pH proper al punt isoelèctric, on la càrrega neta és igual a 0, les forces d'atracció entre molècules predominen i aquestes tendeixen a associar-se, i finalment, es tornen insolubles (Zayas, 1997). De mode que com més s'apropi al punt isoelèctric més baixa serà la solubilitat proteica com succeeix en el tractament de pH 5.5 i, per contra, com més lluny del pH isoelèctric sigui el pH del tractament més alta serà la solubilitat, ja que s'incrementa la força iònica (Bourgeois i Le Roux, 1986), com ocorre al

tractament de pH 7.5. La interacció entre aigua i proteïnes s'incrementa a pH inferiors o superiors al punt isoelèctric, ja que en aquests rangs les proteïnes tenen càrrega positiva o negativa. Concretament, en un rang de pH inferior al punt isoelèctric la càrrega és positiva i en un rang de pH superior al punt isoelèctric la càrrega és negativa (Zayas, 1997).

**Taula 4.3 (a).** Resultats de l'anàlisi de la variància (ANOVA) de la solubilitat proteica de la melsa de porc segons el pH (pH 5.5, 6.5 i 7.5).

	Suma de quadrats	g. ll.	Mitjana quadràtica	F	Sig.
Entre grups	1063.670	2	531.835	21.824	0.000
Dins de grups	292.431	12	24.369		
Total	1356.101	14			

**(b)** Resultats del test de separació de mitjanes HSD Tukey. Es mostren les mitjanes pels grups en els subconjunts homogenis de la solubilitat proteica segons el tractament. Es basa en les mitjanes observades. Utilitza la mida de la mostra de la mitjana harmònica = 5.

Tractament	N	Subconjunt per $\alpha=0.05$		
		1	2	3
5.5	5	33.4980		
6.5	5		43.0380	
7.5	5			54.1060

Segons l'estudi fet per Selmane *et al.* (2008), el pH és el paràmetre principal per l'extracció de proteïna. Ara bé, en el seu cas comparaven la solubilitat proteica de pulmons de porc i vedella en diferents pHs. Però van obtenir un millor rendiment en les condicions en els tractaments a un pH equivalent a 9, a una temperatura de 20 °C i 60 minuts de tractament. A més, també ho van repetir amb una tercera mostra corresponent a carn separada mecànicament dels ossos del cap de pollastre en les mateixes condicions que les dues mostres anteriors, però canviant la temperatura de tractament a 40 °C. En aquestes condicions òptimes va obtenir uns rendiments d'extracció de proteïna d'entre el 64 % i el 83 %. Malgrat que els tractaments es van dur a terme en unes condicions diferents envers l'estudi realitzat, també va obtenir el valor de solubilitat proteica més alt en el tractament de pH més alt.

A partir d'aquests resultats, donat que la primera propietat funcional és la solubilitat, ja que com més alt sigui el grau de solubilitat, cal pensar en un desenvolupament més gran de les

altres propietats com les gelificants i emulsionants, que són bàsiques per productes carnis processats. Així doncs, s'ha comprovat que la melsa té un contingut molt alt de proteïnes amb una elevada solubilitat.

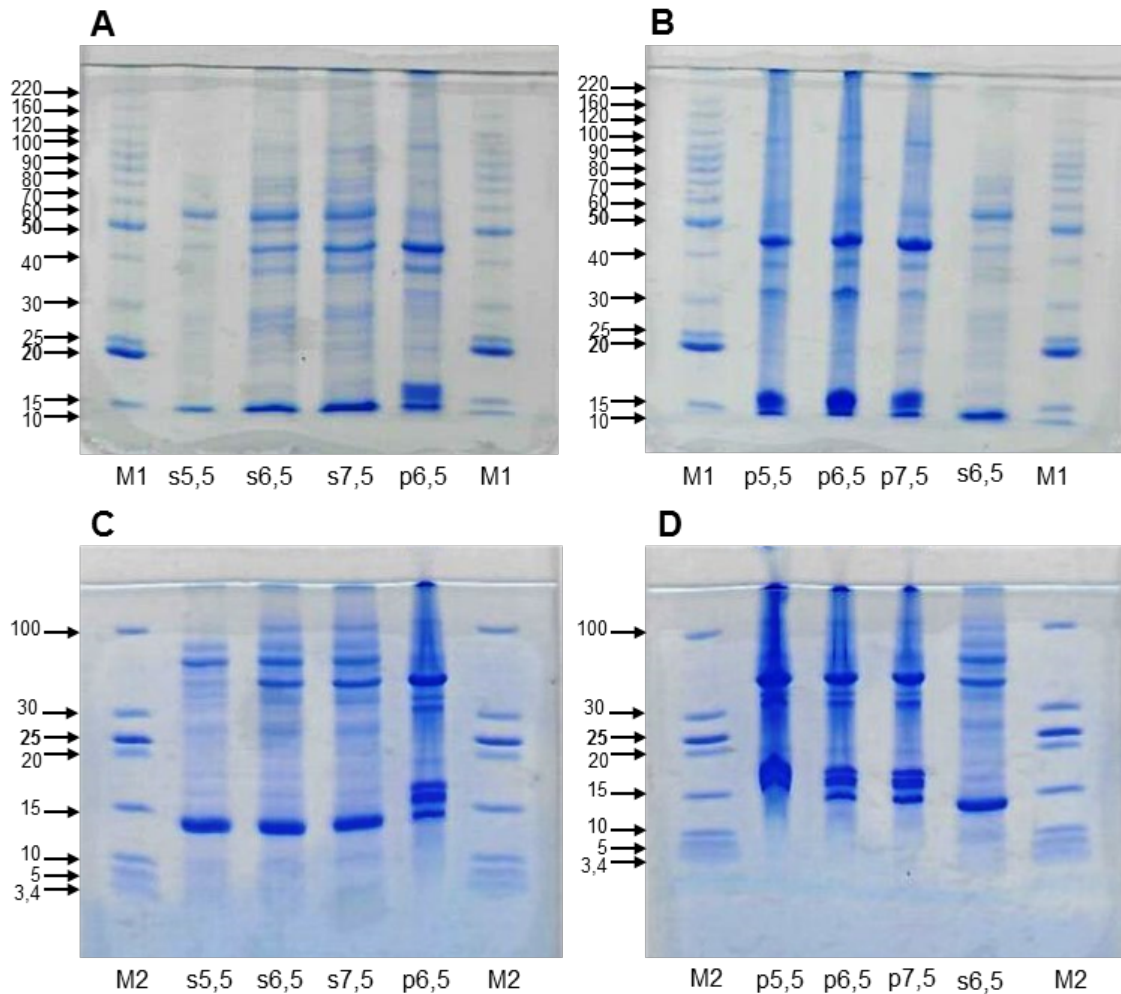
#### 4.5. Electroforesi SDS-PAGE

A la Figura 4.2 es mostren els electroforogrames obtinguts per SDS-PAGE dels extractes proteïcs de melsa de porc obtinguts en la determinació de la solubilitat proteica a pH 5.5, 6.5 i 7.5. Es mostren els perfils electroforètics dels extractes solubles (sobrenedants) i els residus insolubles (*pellets*) obtinguts després de la centrifugació de les solucions.

En primer lloc, en totes les mostres, s'observa la presència d'una banda principal d'alta intensitat, amb un pes molecular (PM) al voltant de 15 kDa, corresponent al monòmer de globina, de l'hemoglobina de la sang (Toldrà *et al.*, 2011). Aquesta banda està sobretot present en les mostres de sobrenedant (Figures 4.2. A i C, línies s5.5, s6.5 i s7.5), però també s'observa en les dels *pellets* (Figures 4.2. B i D, línies p5.5, p6.5 i p7.5). Això confirma la presència de proteïnes de la sang a la melsa.

Per altra banda, en les mostres de *pellets* també s'observa la presència d'unes bandes d'alta intensitat (Figures 4.2. C i D, línies p5.5, p6.5 i p7.5) amb un PM d'entre 15 i 20 kDa, que es podria correspondre a la ferritina (Harrison i Arosio, 1996 i Torti i Torti, 2002). La molècula de ferritina forma una espècie de cavitat interior composta per dues subunitats, anomenades H i L, on 24 subunitats de ferritina s'uneixen per formar la capa d'apoferritina de la cavitat. Cada molècula d'apoferritina de 450 kDa pot aïllar aproximadament 4500 àtoms de ferro, i depenent del tipus de teixit i estat fisiològic de la cèl·lula, el rati de H a L a les subunitats de la ferritina pot variar considerablement. De fet, la forma L predomina majoritàriament en òrgans com el fetge i la melsa. En canvi, la forma H predomina al cor i als ronyons. La funció més important d'aquesta proteïna és la seva activitat enzimàtica, ja que converteix el Ferro (II) en Ferro (III) (Torti i Torti, 2002). A l'apartat 4.3. ja s'ha comentat com la melsa és un bon reservori de ferro.





**Figures 4.2. A, B, C i D.** Gels obtinguts per SDS-PAGE dels extractes proteics procedents de melsa de porc. **A i B:** gels homogenis de 12,5 % de poliacrilamida; **C i D:** gels homogenis de 20 % de poliacrilamida; essent M1: marcador de pes molecular de rang 10-220 kDa; M2: marcador de pes molecular baix de rang 3.4-100 kDa; mostres s5.5, s6.5 i s7.5: sobrenedants a diferents pHs; mostres p5.5, p6.5 i p7.5: *pellets* a diferents pHs.

No obstant, la banda present al voltant de 20 kDa, es pot observar lleugerament a totes les línies de mostres de sobrenedant i *pellet*, també es podria correspondre a la miosina, proteïna del múscul llis present a la melsa, ja que segons Steen *et al.* (2016) aquesta proteïna està composta per dues cadenes de 230 kDa cadascuna i quatre cadenes de 20 kDa. De mode que tot i ser bandes molt febles, es confirmaria la presència de proteïnes miofibrilars a la melsa de porc (Figures 4.2. A, B, C i D).

Per sobre d'un PM de 30 kDa, a les mostres de *pellets* (Figures 4.2. C i D, línies p5.5, p6.5 i p7.5) s'observa la presència d'unes bandes que podrien correspondre a immunoglobulines del plasma sanguini, o a catepsines A, B i D.

Entre 40 i 50 kDa, a les mostres de sobrenedant (Figures 4.2. A, C i D, línies s6.5 i s7.5) i de *pellets* (Figures 4.2. B i D, línies p5.5, p6.5 i p7.5), també s'observen unes bandes d'alta intensitat que podrien correspondre a l'actina, l'altre proteïna del teixit muscular llis, que té un PM de 42 kDa, segons Steen *et al.* (2016).

Al voltant de 60 kDa a les mostres de sobrenedant (Figures 4.2. A i C, línies s5.5, s6.5 i s7.5) s'observen unes bandes d'alta intensitat que podrien correspondre a les globulines, o bé a l'albumina de sang, ja que aquesta té un pes molecular de 68 kDa. (Ogan, 1987). En aquest ventall de bandes també es troben els altres tipus de globulines ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) segons SIGMA-ALDRICH (2016) i cadascuna d'aquestes està formada per moltes proteïnes amb PM molt diferents.

Finalment, pel que fa a les proteïnes del teixit connectiu, en els resultats de l'electroforesi també es pot observar que hi ha presència de col·lagen. En aquest cas, el col·lagen monomèric tipus I consisteix en el col·lagen  $\alpha$ -1 de 139 kDa i l' $\alpha$ -2 de 129 kDa. No obstant, el col·lagen tipus I és una estructura triple hèlix que consisteix en una cadena  $\alpha$ -2 i dues cadenes  $\alpha$ -1. Així, es poden obtenir bandes de la forma dimèrica del col·lagen d'aproximadament 270 kDa i de la forma trimèrica de 400 kDa (Protocol online, 2009). Tanmateix, el PM màxim que s'ha pogut observar en els gels realitzats en aquest estudi és de 220 kDa, per tant, no podem confirmar la presència d'aquestes bandes de col·lagen d'alt PM. Però es pot pensar que la banda que s'observa entre 100 i 120 kDa, tot i no arribar als 129 kDa, podria correspondre a la cadena  $\alpha$ -2 de col·lagen, tal com s'observa a les mostres de sobrenedant (Figures 4.2. A, C i D, línies s6.5 i s7.5) i de *pellets* (Figures 4.2. A, B, C i D, línies p5.5, p6.5 i p7.5).

El fibrinogen és una altra proteïna del teixit connectiu que és sintetitzada al fetge i circula pel plasma de la sang. És una glicoproteïna (de 340 kDa) composta per tres cadenes de pèptids:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , de 63.5 kDa, 56 kDa, i 47 kDa, respectivament (SIGMA-ALDRICH, 2016). En els electroforogrames dels extractes de melses s'observen unes bandes d'alta intensitat al voltant de 60 kDa a les mostres de sobrenedant (Figures 4.2. A i C, línies s5.5, s6.5 i s7.5) que es podrien correspondre a les cadenes alfa i beta del fibrinogen. Per últim, entre un PM de 40 kDa i 50 kDa a les mostres de sobrenedant (Figures 4.2. A, C i D, línies s6.5 i

s7.5) i *pellets* (Figures 4.2. B i D, línies p5.5, p6.5 i p7.5) s'observen unes bandes d'alta intensitat que podrien correspondre a la cadena  $\gamma$  del fibrinogen.

#### 4.6. Anàlisi calorimètrica diferencial (DSC)

Per complementar l'estudi de les proteïnes de la melsa es van avaluar alguns paràmetres calorimètrics mitjançant la tècnica DSC (*Differential Scanning Calorimetry*).

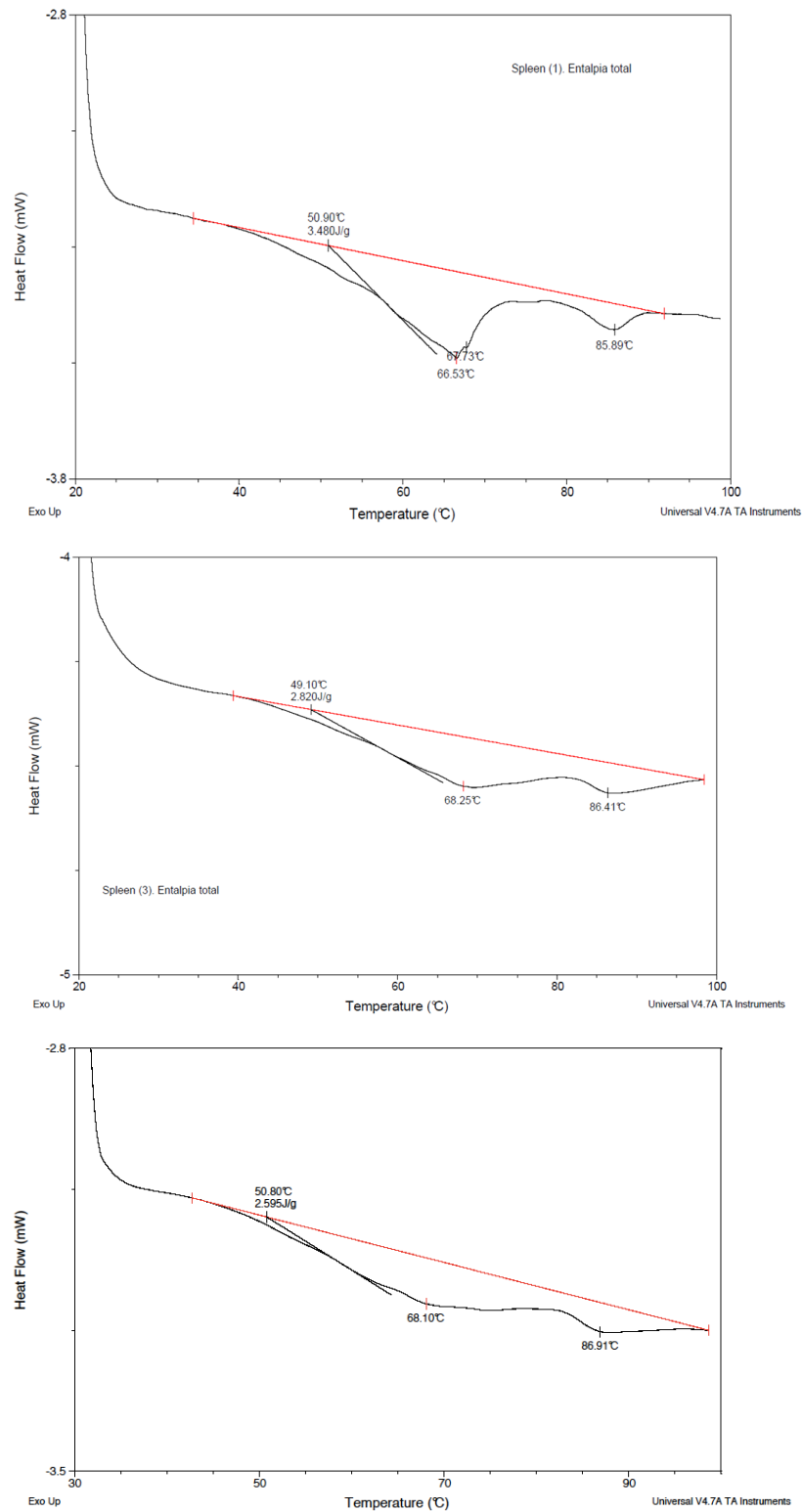
A les Figures 4.3 A, B i C es poden observar els termogrames obtinguts per DSC de les mostres de melses de porc, en els quals es representa el flux de calor (mW) subministrat a la mostra necessari per aconseguir l'equilibri tèrmic entre aquesta i la referència, en funció de la temperatura aplicada.

En un termograma es poden observar els pics corresponents als canvis entàlpics soferts pel material durant l'experiment. Generalment, el termograma d'una proteïna és una corba que té una transició, en forma de pic endotèrmic, que es és conseqüència de l'absorció de la calor associada amb la desnaturalització de la proteïna, o bé conjunt de proteïnes, induïda per la temperatura (Conejero *et al.*, 2000).

En els tres assaigs realitzats per DSC sobre mostres de melses de porc s'observen dos pics endotèrmics. Si comparem la forma i magnitud dels termogrames de les melses, no s'observen gaires diferències pel que fa a la forma i a la posició dels pics endotèrmics. Tot i que, a la Figura 4.3. A el primer pic endotèrmic és més pronunciat que els de les Figures 4.3. B i C. Malgrat aquesta petita diferència, tots tres termogrames presenten el mínim del pic endotèrmic de més magnitud al voltant de 68 °C, i un segon pic endotèrmic amb un mínim al voltant dels 86 °C.

A partir dels termogrames obtinguts per DSC, es van determinar: la temperatura de desnaturalització proteica ( $T_d$ ) dels pics endotèrmics, 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 ( $\Delta H$ ), 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 (Taula 4.4). En aquest estudi es va calcular tant l'entalpia total, incloent els 2 pics que s'observaven en els termogrames, com les entalpies parcials corresponents a cada pic.

Aquests paràmetres permeten distingir les propietats tèrmiques de les mostres i avaluar l'estabilitat de les proteïnes o d'una proteïna determinada enfront l'escalfament, de forma que podem treure informació sobre la temperatura de desnaturalització proteica.



**Figures 4.3. A, B i C:** Termogrames obtinguts per DSC de 3 mostres diferents de melsos de porc. Velocitat d'escalfament:  $3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{m}^{-1}$ .

**Taula 4.4.** Propietats tèrmiques de les melses de porc obtingudes mitjançant DSC. Velocitat d'escalfament:  $3\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{m}^{-1}$ . Es mostren valors de la mitjana  $\pm$  desviació estàndard ( $n=3$ ).

$\Delta H_T$ (J/g) <sup>(1)</sup>	$\Delta H_P$ (J/g) <sup>(2)</sup>	Td ( $^{\circ}\text{C}$ ) <sup>(3)</sup>
2.97 $\pm$ 0.46	1.67 $\pm$ 0.70 (pic 1)	67.83 $\pm$ 0.61 (pic 1)
	0.25 $\pm$ 0.02 (pic 2)	86.40 $\pm$ 0.29 (pic 2)

<sup>(1)</sup> Variació d'entalpia total de transició del procés de desnaturalització proteica.

<sup>(2)</sup> Variació d'entalpia parcial de transició del procés de desnaturalització proteica.

<sup>(3)</sup> Temperatura de desnaturalització proteica (pic endotèrmic).

La variació d'entalpia total de transició obtinguda a partir dels tres termogrames (Figures 4.3. A, B i C) és de 2.97 J/g, i la variació d'entalpia parcial de transició és de 1.67 J/g al primer pic endotèrmic i de 0.25 J/g al segon pic endotèrmic.

La disminució del valor de l'entalpia a la Figura 4.3. C, indica una menor estabilitat tèrmica de la mostra respecte les altres dues melses (Figura 4.3. A i B). D'altra banda si es comparen els valors de temperatura de desnaturalització de les tres mostres són molt similars.

De fet, segons l'estudi fet per Fukuoka *et al.* (2011) es va veure que si a la carn de porc curada s'analitzava amb el DSC, el termograma obtingut tenia tres pics endotèrmics amb una temperatura màxima de desnaturalització amb valors al voltant de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  que corresponia a la miosina, un altre al voltant de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  que corresponia al col·lagen i proteïnes sarcoplasmàtiques, i l'últim, al voltant de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  que corresponia l'actina. Malgrat que aquest estudi es va realitzar amb extractes solubles i no amb el teixit de la carn curada, i a més es va afegir NaCl que augmenta la interacció iònica de les proteïnes i en baixa la temperatura de desnaturalització, fa pensar que el pic endotèrmic de  $67.83\text{ }^{\circ}\text{C}$  seria la temperatura de desnaturalització del col·lagen present a les melses i de les cèl·lules sarcoplasmàtiques, ja que cal recordar que la melsa actua com a filtre de la sang i de reservori d'eritròcits. De manera que es troba gran quantitat d'hemoglobina, albúmina i diferents tipus de globulines (proteïnes de la sang). No obstant, segons Serrat (2004) la temperatura de desnaturalització

de l'hemoglobina és de 78.3 °C, i per tant, difereix molt respecte els 60 °C obtinguts per Fukuoka *et al.* (2011). Per altra banda, a l'estudi de Parés *et al.* (1996) sobre anàlisis per DSC de mostres de plasma de sang de porc analitzades en les mateixes condicions que les estudiades al treball, les proteïnes plasmàtiques mostraven conjuntament una temperatura de desnaturalització al voltant 75.5 °C.

En un estudi de Fernández *et al.* (2000), on analitzaven carn picada de porc fresca amb DSC, van observar quatre zones endotèrmiques principals en comptes de tres i van suggerir que el primer pic endotèrmic està associat a la miosina (58.6 °C); els dos següents a les proteïnes sarcoplasmàtiques (64.6 °C) i a les proteïnes del teixit connectiu (70.5 °C), però normalment està focalitzat en un sol pic endotèrmic, degut a la poca diferència entre els valors del mínim de temperatura. Per últim, el quart pic endotèrmic es correspondria amb l'actina (80.1 °C). Fet que suggereix que el pic endotèrmic de 86.40 °C que s'ha observats en els termogrames seria la temperatura de desnaturalització de l'actina que hi ha a les melses.

#### **4.7. Discussió global dels resultats més rellevants i perspectives de futurs estudis**

S'ha comprovat que la melsa de porc és un òrgan ric en proteïna (17%), que destaca per tenir un nivell de proteïna càrnica acceptable de bona qualitat, ja que el contingut de col·lagen present és relativament baix. A més, és majoritàriament soluble (54% de solubilitat proteica a pH 7.5). Això fa pensar que poden ser proteïnes funcionals amb bona capacitat de retenció d'aigua, capacitat emulsionant, escumant i gelificant. De cara a futurs estudis, en l'aspecte nutricional seria interessant analitzar el valor biològic de les proteïnes obtingudes a l'estudi electroforètic i comprovar les similituds amb el valor biològic de les proteïnes de la carn. A més, també es podria fer un aminograma per observar quins aminoàcids es troben a la melsa. Així mateix, seria important veure la naturalesa dels greixos per saber el contingut de colesterol present a la melsa i determinar si aquests greixos són saturats o insaturats i en quina quantitat.

Per altra banda, l'alt contingut de ferro és bo en l'aspecte nutricional. Ara bé, un excés o alta quantitat d'aquest pot provocar oxidacions lipídiques en els productes on s'afegeixi, tot i presentar un baix contingut de greixos (3%). Tot i que el deteriorament ha de ser mínim,

està descrit que el ferro del grup hemo de l'hemoglobina pot actuar com a catalitzador de les reaccions d'oxidació autocatalítica dels lípids (Toldrà i Carretero, 1998).

No obstant, s'haurien de fer estudis més extensos per obtenir suficient quantitat de concentrat proteic, ja que s'estima que aquest seria l'ús principal de les proteïnes de la melsa en un futur a la indústria càrnica, dietètica i alimentació animal. A part, també s'haurien de fer tractaments d'extracció i determinació de la proteïna soluble a altres valors de pH, per sobre de 7.5, per tal de determinar el màxim percentatge de la solubilitat proteica. Així, també es podrien determinar les propietats funcionals dels extractes proteics de melsa esmentats anteriorment i comprovar com se n'extreu el major rendiment aplicat a un sèrie de productes.

Un altre tema important, seria fer un estudi de com es podria etiquetar el concentrat proteic de melsa, de cares a la seva possible comercialització per ser aplicat a productes alimentaris.

Finalment, la justificació principal de la realització d'aquest estudi és la quantitat total de proteïna desaprofitada o en desús. De mode que tenint en compte només els porcs sacrificats a Catalunya s'obtindria al voltant de 700 tones de proteïna pura a l'any de la melsa que avui en dia es desaprofiten.

## 5. CONCLUSIONS

1. El recompte de bacteris aerobis mesòfils totals de les melses de porc ha sigut de l'ordre de 4.9 unitats logarítmiques i es troba dins del rang d'acceptabilitat dels criteris d'higiene de processament de productes carnis.
2. Pel que fa a la composició química de les melses, el contingut de proteïna és aproximadament del 17 %, el contingut de cendres és d'1.34 %, el percentatge de greixos és de 2.93 % i el de la humitat és del 78.85 %. A més, el percentatge d'hidroxiprolina és del 0.2 % i, per tant, el de col·lagen és del 1.60 %. Per últim, el contingut de ferro és de 319.7 ppm.
3. El percentatge de solubilitat proteica dels extractes de melses porcines a pH 5.5, 6.5 i 7.5 és del 34 %, 43 % i 54 %, respectivament, obtenint una quantitat de proteïna soluble més alta en incrementar el pH.
4. L'estudi electroforètic i l'anàlisi calorimètrica diferencial de rastreig (DSC) han permès confirmar que les principals proteïnes presents a la melsa de porc són majoritàriament les provinents de la sang (hemoglobina, albúmina, globulines i fibrinogen), proteïnes del múscul llis (actina i miosina), i col·lagen del teixit connectiu.



## 6. BIBLIOGRAFIA

Amersham Biosciences. (1998). *Separations Technique File PhastSystem: SDS-PAGE in homogeneous media*. Suècia: Wilkströms.

Amersham Biosciences. (2004). *Electrophoresis: PhastiSystem, PhastGel media, and accessories*. Suècia: Wilkströms.

Amo, A. (1980). *Industria de la carne: salazones y chacineria* (1a ed.). Barcelona: AEDOS. 304 p.

A.O.A.C. 1980. *Official Methods of Analysis*, 13th ed. Washington, D.C.: International Association of Official Analytical Chemists. 1141 pp.

Bautista, M.J., Carrasco, L., Pérez, J., Chacón, M., de Lara, F., Hervás, J., Sierra, M.A. (1994). Estudio comparativo del bazo en los diferentes mamíferos domésticos. *Anales de veterinaria de Murcia*, p. 83-97. Recuperat de <http://revistas.um.es/analesvet/article/viewFile/18621/17961>. [Data de consulta: 24/7/16]

Bayés, C. (2009). Aplicació de la tècnica d'espectroscòpia d'absorció atòmica de flama com a eina per al manteniment de vehicles (Treball final de carrera). Universitat de Girona, Espanya. Recuperat de [http://dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/1344/2\\_MEMORIA.pdf?sequence=2](http://dugi-doc.udg.edu/bitstream/handle/10256/1344/2_MEMORIA.pdf?sequence=2). [Data de consulta: 24/6/16]

Bourgeois, C.M., i Le Roux, P. (1986). *Proteínas animales: Extractos, concentrados y aislados en la alimentación humana*. Ed. El Manual Moderno, S.A., Mèxic, D.F. 346 pp. Traducció de: *Protéines Animales*. 1982. Technique et Documentation, París, França.

Calorimetry Sciences Corporation. (2006). *Characterizing Protein Stability by DSC*. Estats Units: Life Sciences Application Note.

Código Alimentario Español. (1967). *Código alimentario: principios generales*. Recuperat de <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/nutrihum/ResumenCodigoAlimentario.pdf>. [Data de consulta: 25/6/16]

Codony, R., Boatella, J., Rafecas, M., Guardiola, F. (2002). *Anàlisi d'aliments –(Textos docents;* 264). Recuperat de <https://books.google.es/books?id=6r5Gej4K29QC&pg=PA153&dq=determinació+proteïna+aliments&hl=ca&sa=X&ved=0ahUKEwio1synrLzNAhXIExoKHZKdDAkQ6AEIHTAA#v=onepage&q=determinació%20proteïna%20aliments&f=true>. [Data de consulta: 23/6/16]

Conejero, F., López, O. i Sadqui, M. 2000. *Estudio Termodinámico de los Estados Parcialmente Plegados del Dominio SH3 de  $\alpha$ -Espectrina*. Recuperat de <http://www.ugr.es/~qmfisica/espanol/QFciencias/Docencia/Ficheros/Doctorado/Microcalorimetria/DSC>. [Data de consulta: 23/7/16]

Costa-Pau, M., i Carreras, J. (8 de maig de 2015). Riudellots de la Selva, capital europea del sacrifici de porcs. *Ara.cat*. Recuperat de [http://www.ara.cat/comarquesgironines/Riudellots-Selva-capital-europea-sacrifici\\_0\\_1353464658.html](http://www.ara.cat/comarquesgironines/Riudellots-Selva-capital-europea-sacrifici_0_1353464658.html). [Data de consulta: 30/6/16]

Clínica Universidad de Navarra. (2015). Diccionario médico. Recuperat de <http://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/hidroxiprolina>. [Data de consulta: 21/7/16]

European Food Information Council. (2008). *Documentos básicos: Proteínas*. Recuperat de <http://www.eufic.org/article/es/expid/Proteinas/>. [Data de consulta: 25/6/16]

Consejería de Salud. Dirección General de Consumo. 2011. Reglament 854/2004, de 24 d'abril pel que s'estableixen normes específiques per l'organització de controls oficials dels productes d'origen animal destinats al consum humà. (CE [en línia], núm 854, 24-4-2008, pàg. 1-62). Recuperat de <http://www.consumoresponde.es/sites/default/files/Reglamento%20854-2004%20Productos%20origen%20animal.pdf>. [Data de consulta: 24/7/16].

Experimental Biosciences. (2012). *Gel electrophoresis*. Recuperat de <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/gellab2.html>. [Data de consulta: 23/6/16]

Fernández, F., Fernández, P., Carballo, J., Jiménez, F. (2000). DSC study on the influence of meat source, salt and fat levels, and processing parameters on batters pressurisation. *European Food and Research Technology*, 211, 387-392.

Fukuoka, M., Kajitani, S., Sakai, N. (2011). Kinetics of Thermal Denaturation of Protein in Cured Pork Meat. *Japan Journal of Food Engineering*, 12 (1), 19-26.

Fundación Española del Corazón. (2013). *Carne*. Recuperat de <http://www.fundaciondelcorazon.com/nutricion/alimentos/carne.html>. [Data de consulta: 26/6/16]

Fundación Española del Corazón. (2013). *Huevo*. Recuperat de <http://www.fundaciondelcorazon.com/nutricion/alimentos/huevo.html>. [Data de consulta: 26/6/16]

Fundación Española del Corazón. (2013). *Leche, Yogur y Queso*. Recuperat de <http://www.fundaciondelcorazon.com/nutricion/alimentos/leche-yogur-y-queso.html>. [Data de consulta: 26/6/16]

Fundación Española del Corazón. (2013). *Pescado*. Recuperat de <http://www.fundaciondelcorazon.com/nutricion/alimentos/pescado.html>. [Data de consulta: 26/6/16]

Fundación Española del Corazón. (2013). *Proteínas*. Recuperat de <http://www.fundaciondelcorazon.com/nutricion/nutrientes/810-proteinas.html>. [Data de consulta: 26/6/16]

Gaitán, D., Olivares, M., Arredondo, O., Pizarro, F. (2006). Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Revista chilena de nutrición*, 33 (2), 142-148. Recuperat de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182006000200003](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182006000200003). [Data de consulta: 27/7/16]

García, H. M. (2001). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Universo diagnóstico*, 1 (2), 31-41.

Gil, F., Ramírez, G., Ayala, M.D., López, o., Latorre, R., Martínez, F., Sánchez, C., Arencibia, A., Orenes, M., Vazquez, J.M. (-). Anatomía interactiva del cerdo. Universitat de Múrcia. Recuperat de <https://www.um.es/anatvet/interactividad/ingles/pigs/Anatom%EDa%20Interactiva%20del%20Cerdo.pdf>. [Data de consulta: 24/7/16]

Gill, C.O. (1988). Microbiology of Edible Meat By-products. Pearson A. M. i Dutson T.R. (ed.), *Edible Meat By-products: Advances in Meat Research, Volume 5* (1a ed., p. 47-75). Barking: Anglaterra.

Godfray, J. H. C., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., Toulmin, C. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science*, 327 (5967), 812-818. Recuperat de <http://science.sciencemag.org/content/327/5967/812.full.pdf+html>. [Data de consulta: 26/6/16]

Grant, R.A., Courts, A., Evans, M.T.A., Gordon, J.F., Horn, J.D., Seal, R., Pirie, N.W., Sharphouse, J.H., Ranken, M.D., Filstrup, P., Delaney, R. A. M., Scawen, M.D., Atkinson, A., Darbyshire, J. (1980). Utilization of Waste Protein Sources. R.A. Grant (ed.), *APPLIED PROTEIN CHEMISTRY* (1a ed., p. 223-231). Barking.

Grupo de Alimentos de la Sociedad Española de Microbiología. (2010). *Normas microbiológicas por alimentos*. Recuperat de [http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/\\*/\\*/\\*normicro.htm](http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/*/*/*normicro.htm). [Data de consulta: 9/7/16]

Guardiola, F., Andrés, C., Castellote, A.I., Codony, R., Lamuela, R., López, C., Riu, M. (2007). *Pràctiques d'anàlisi d'aliments. (Textos docents; 325)*. Recuperat de <https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=J3xnbtri-8C&oi=fnd&pg=PA21&dq=determinació+cendres+aliments&ots=7HI9LfnoDX&sig=xzDqhfM0VlswfXFo7Pn4g4k5LI#v=onepage&q=determinació%20cendres%20aliments&f=false>. [Data de consulta: 22/6/16]

Harrison, P. M. i Arosio, P. (1996). The ferritin: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1275, 161 – 203.

Herrera, C.H., Bolaños, N., Lutz, G. (2003). *Química de Alimentos : Manual de laboratorio*. Recuperat de <https://books.google.es/books?id=8VpJ8foyDilC&pg=PA29&dq=soxhlet+grasas&hl=ca&sa=X&ved=0ahUKEwiYq-yu07zNAhVDMBoKHSEvCOoQ6AEIQDAE#v=onepage&q=soxhlet%20grasas&f=false>. [Data de consulta: 22/6/16]

Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrisna, K., Bawa, A.S. (2012). Utilization of by-products and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 49 (3), 278-293.

Malvern Instruments Ltd. (2016). *Differential Scanning Calorimetry: Confident characterization of protein stability*. Recuperat de <http://www.malvern.com/en/products/technology/differential-scanning-calorimetry/default.aspx?webSyncID=26a6e853-8873-b132-7211-38697b89d4ae&sessionGUID=ed3dd68e-2300-c4a3-1945-69ce86cdc366>. [Data de consulta: 23/6/16]

Megías, M., Molist, P., Pombal, M.A. (2015). *Atlas de histología vegetal y animal*. Recuperat de <http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/linfatico-bazo.php>. [Data de consulta: 24/7/16]

Menton, D. (2011). *Articles By Answers with Ken Ham: The Mysterious Spleen*. Recuperat de <http://www.oneplace.com/ministries/answers-in-genesis/read/articles/the-mysterious-spleen-13659.html>. [Data de consulta: 26/7/16]

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. *Journal of Food Science*, 50, 1715-1718.

Movilla, J.C. (2012). *Subproductos de origen animal (glandulas)*. Recuperat de <http://tirsomestre.blogspot.com.es/?m=1>. [Data de consulta: 24/7/16]

National Diagnostics. (2011). *Electrophoresis*. Recuperat de <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/native-protein-electrophoresis>. [Data de consulta: 23/6/16]

Neuman, R.E., i Logan, M.A. (1950). The determination of collagen and elastin in tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 186, 549-556. Recuperat de <http://www.jbc.org/content/186/2/549.short#ref-list-1>. [Data de consulta: 12/7/16]

Nose To Tail At Home. (2008). *Rolled Pig's Spleen*. Recuperat de <http://nosetotailathome.com/2008/01/13/rolled-pigs-spleen/>. [Data de consulta: 25/7/16]

Ockerman, H.W., i Hansen, C.L., (1994). Industrialización de subproductos de origen animal. Ed. Acribia, S.A., Saragossa. 387 pp. Traducción de: Animal By-product Processing. 1988. Ellis Horwood Ltd., Chichester, Inglaterra.

Ogan, M., Schmiedl, U., Moseley, M., Grodd, W., Paajanen, H., Brasch, R. (1987). Albumin Labeled with Gd-DTPA: An intravascular Contrast-Enhancing Agent for Magnetic Resonance Blood Pool Imaging: Preparation and Characterization. *Investigate Radiology*, 22 (8), 621-702.

Ohshima, T., Suzuki, T., Koizumi, C. (1993). New developments in surimi technology. *Trends in Food Science & Technology*, 4 (6), 157-163.

Parés, D., Saguer, E., Carretero, C., Saurina, J. (1996). Aplicación de la técnica de análisis calorimétrico diferencial al estudio de la fracción plasmática de sangre porcina. *ALIMENTACIÓN: Equipos y Tecnología*, septiembre, 41-45.

Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J.J., Toldrà, M., Carretero, C. (1998). 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., Sanchez, E., Carretero, C. (1998). Estabilidad durante el almacenamiento de las propiedades funcionales del plasma porcino deshidratado. *ALIMENTACIÓN: Equipos y Tecnología*, enero-febrero, 97-103.

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.

Protocol online. (2009). *Human collagen type I molecular weight*. Recuperat de <http://www.protocol-online.org/biology-forums-2/posts/9640.html>. [Data de consulta: 7/8/16]

Rahman, U., Sahar, A., Khan, M.A. (2014). Recovery and utilization of effluents from meat processing industries. *Food Research International*, 65: 322-328.

Rodríguez, I. (1994). Aprovechamiento de Subproductos de la Industria Cárnica. *ALIMENTACIÓN: Equipos y Tecnología*, 69-73.

Rius Bofill, N., Berlanga Hernanz, M., Marqués Villavechia, A.M. (2006). *Anàlisi microbiològica i higiene dels aliments*. –(UBe. *Microbiologia*; 1). Recuperat de [https://books.google.es/books?id=yYhKBgAAQBAJ&pg=PA19&lpg=PA19&dq=aerobis+mefils&source=bl&ots=jQ8kNlcwiE&sig=sRUKTcLIngalZMAwDmYf14OozYQ&hl=ca&sa=X&ved=0ahUKEwjSzufm\\_7PNAhVGmBoKHa9mDhUQ6AEIGzAA#v=onepage&q=aerobis%20mefils&f=false](https://books.google.es/books?id=yYhKBgAAQBAJ&pg=PA19&lpg=PA19&dq=aerobis+mefils&source=bl&ots=jQ8kNlcwiE&sig=sRUKTcLIngalZMAwDmYf14OozYQ&hl=ca&sa=X&ved=0ahUKEwjSzufm_7PNAhVGmBoKHa9mDhUQ6AEIGzAA#v=onepage&q=aerobis%20mefils&f=false). [Data de consulta: 22/6/16]

Rude, M. (9 de febrer de 2016). Osona: cinc porcs per persona. *Directa*. Recuperat de <https://directa.cat/osona-cinc-porcs-persona>. [Data de consulta: 30/6/16]

Selmane, D., Christophe, V., Gholamreza, D. (2008). Extraction of proteins from slaughterhouse by-products: Influence of operating conditions on functional properties. *Meat Science*, 79, 640-647.

Selmane, D., Christophe, V., Gholamreza, D. (2010). Production and functional properties of beef lung protein concentrates. *Meat Science*, 84, 315-322.

Seong, P.N., Park, K.M., Cho, S.H., Kang, S.M., Kang, G. H., Park, B. Y., Moon, S.S., Ba, H.V. (2014). Characterization of Edible Pork By-products by Means of Yield and Nutritional Composition. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 34 (3), 297-306.

Spooncer, W.F. (1988). Organs and Glands as Human Food. Pearson A. M. i Dutson T.R. (ed.), *Edible Meat By-products: Advances in Meat Research, Volume 5* (1a ed., p. 47-75). Barking: Anglaterra.

Serrat, M. (2004). Aplicació de la homogeneïtzació a alta pressió per hemolitzar la fracció cel·lular de la sang de porc procedent d'escorxadors industrials (Treball final de carrera). Universitat de Girona, Espanya.

SIGMA-ALDRICH. (2016). *Fibrinogen & Fibrin*. Recuperat de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/fibrinogen-and-fibrin.html>. [Data de consulta: 7/8/16]

SIGMA-ALDRICH. (2016). *Plasma Protein Composition*. Recuperat de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/plasma-blood-protein/plasma-protein-composition.html#α-Globulins>. [Data de consulta: 28/8/16]

Steen, L., Glorieux, S., Goemaere, O., Brijis, K., Paelinck, H., Foubert, I., Fraeye, I. (2016). Functional Properties of Pork Liver Protein Fractions. *Food and Bioprocess Technology*, 9 (6), 970 – 980.

The Offal Club. (2012). *The year of living dangerously / return of the spleen*. Recuperat de <http://theoffalclub.blogspot.com.es/2012/09/the-pig-liver-pate-rolled-spleen.html>. [Data de consulta: 25/7/16]

Toldrà, F., Aristoy, M.C., Mora, L., Reig, M. (2012). Innovations i value-addition of edible meat by-products. *Meat Science*, 92 (3), 290-296.

Toldrà, M., Parés, D., Saguer, E., Carretero, C. (2011). Hemoglobin hydrolysates from porcine blood obtained through enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12 (4), 435 - 442.

Toldrà, M. i Carretero, C. (1998). Isotermas de sorción de la fracción celular de la sangre de cerdo deshidratada por atomización según el modelo gab. *Alimentaria*, julio-setiembre, 45-51.

Torti, F. M. i Torti S. V. (2002). Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*, 99 (10), 3505 - 3516.

Trippy food. (2012). *God Save The Spleen: Pork spleen*. Recuperat de <http://www.trippyfood.com/2012/03/12/god-save-the-spleen/>. [Data de consulta:25/7/16]

Weston, A., Rogers, R., Althen, T. (2002). The Role of Collagen in Meat Tenderness. *The professional animal scientist*, 18 (2), 107-111. Recuperat de [http://www.professionalanimalscientist.org/article/S1080-7446\(15\)31497-2/abstract](http://www.professionalanimalscientist.org/article/S1080-7446(15)31497-2/abstract). [Data de consulta:26/6/16]

Wu, G., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Kim, S. W., Knabe, D. A., Li, P., Mcknight, J.R., Satterfield, M. C., Spencer, T. E. (2011). Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*, 40 (4), 1053–1063. Recuperat de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3773366/>. [Data de consulta: 21/7/16]



Zayas J. F., (1997). *Functionality of Proteins in Food*. Recuperat de [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-59116-7\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-59116-7_2). [Data de consulta: 22/6/16]